

Université de Montréal

EFFETS DES TOXINES INSECTICIDES DU BACILLE DE THURINGE SUR LA PERMÉABILITÉ DES
VÉSICULES DE MEMBRANE À BORDURE EN BROsse INTESTINALE DU SPHINX DU TABAC

par

Martin Kirouac

Département de physique

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en physique
option biophysique et physiologie moléculaire

juin 2006

© Martin Kirouac, 2006



QC

3

U54

2006

V.028

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Effets des toxines insecticides du bacille de Thuringe sur la perméabilité des vésicules
de membrane à bordure en brosse intestinale du sphinx du tabac

présentée par :
Martin Kirouac

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Professeur Jean-Yves Lapointe
Directeur de recherche : Professeur Raynald Laprade
Membre du jury : Professeur Alfred Berteloot
Examineur externe : Docteur Roger Frutos
Représentant du doyen : Professeur Marc Amyot

Thèse acceptée le : _____

RÉSUMÉ

Le bacille de Thuringe (*Bacillus thuringiensis*) produit une variété de toxines insecticides spécifiques qui sont utilisées à grande échelle en agriculture, en foresterie et en santé publique. Une fois activées, ces toxines agissent en formant des pores dans la membrane luminale des cellules épithéliales de l'intestin moyen des insectes sensibles. Ces pores abolissent les gradients ioniques, ce qui cause la mort des cellules intestinales et, par la suite, celle de l'insecte. La sélectivité ionique des pores formés par la Cry1Aa et la Cry1Ac dans des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées de l'intestin moyen du sphinx du tabac (*Manduca sexta*) a été analysée avec une technique de gonflement osmotique basée sur des mesures de lumière diffusée. Les ions divalents et les acides aminés diffusent bien au travers des pores ; ceux-ci ont une légère sélectivité pour les cations par rapport aux anions. L'effet des toxines a aussi été analysé avec les mêmes vésicules et une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire. Les toxines actives (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea) réduisent efficacement le potentiel membranaire généré par l'efflux de K^+ en présence de valinomycine. Par ailleurs, contrairement à une opinion largement répandue, les pores formés par la toxine ne modifient que très peu la sélectivité ionique endogène de la membrane. Les résultats obtenus suggèrent un effet différentiel de la force ionique et du pH sur l'activité des toxines et que d'autres facteurs sont aussi susceptibles de l'influencer. Afin de déterminer si les protéases membranaires peuvent modifier l'activité de la Cry1Aa activée avec la trypsine, une variété d'inhibiteurs de protéases ont été testés dans des expériences de gonflement osmotique. Ces dernières montrent que la Cry1Aa est complètement fonctionnelle et ne requiert pas de protéolyse additionnelle. Finalement, les variations du volume des vésicules mesurées avec la technique de gonflement osmotique ont été comparées avec les prédictions d'un modèle théorique. L'analyse montre que, suivant un choc osmotique, une force mécanique semble contribuer au regonflement des vésicules de membrane à bordure en brosse. Cette force dépendrait de la présence du cytosquelette.

Mots clés : toxines insecticides, perméabilité membranaire, sélectivité ionique, potentiel membranaire, vésicules de membrane à bordure en brosse, gonflement osmotique, diS-C₃(5), inhibiteurs de protéases, *Bacillus thuringiensis*, *Manduca sexta*.

SUMMARY

Bacillus thuringiensis produces a variety of specific insecticidal toxins which are widely used in agriculture, forestry and public health. Once activated, these toxins act by forming pores in the luminal membrane of the midgut epithelial cells of susceptible insect pests. These pores abolish the ionic gradients and lead to cell lysis and eventually to insect death. The ionic selectivity of the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac in midgut brush border membrane vesicles purified from the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) was analyzed with an osmotic swelling technique based on light-scattering measurements. Amino acids and divalent ions diffuse well across the pores and these are slightly more selective for cations than for anions. The activity of the toxins was also monitored with a potential-sensitive fluorescent probe. Active toxins (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea) efficiently reduced the membrane potential generated by the efflux of K^+ in the presence of valinomycin. However, despite a widespread opinion, the pores formed by the toxin only slightly change the ionic selectivity of the membrane. Our results suggest a differential effect of ionic strength and pH, and that other factors are also susceptible to influence the activity of the toxins. To investigate whether membrane proteases are involved in the activity of the trypsin-activated Cry1Aa, a variety of protease inhibitors were tested with the osmotic swelling assay. The results of these experiments indicate that Cry1Aa is completely functional and does not require further proteolysis. Finally, the variations in the volume of the vesicles measured with the osmotic swelling assay were compared with the predictions of a theoretical model. This analysis shows that, following the osmotic shock, a mechanical force, which probably involves the cytoskeleton, appears to contribute to the swelling of the brush border membrane vesicles.

Key words: insecticidal toxins, membrane permeability, ion selectivity, membrane potential, brush border membrane vesicles, osmotic swelling, diS-C₃(5), protease inhibitors, *Bacillus thuringiensis*, *Manduca sexta*.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Summary	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations.....	xvi
Dédicace.....	xviii
Remerciements.....	xix
Chapitre 1. Introduction	1
1.1. Utilisation de <i>B. thuringiensis</i> comme bioinsecticide	2
1.2. Classification et nomenclature des toxines de <i>B. thuringiensis</i>	5
1.3. Structure des toxines	6
1.4. La cible des toxines insecticides : l'intestin moyen de l'insecte.....	9
1.5. Mode d'action des toxines insecticides Cry chez les lépidoptères.....	10
1.5.1. Solubilisation et activation de la protoxine dans l'intestin de l'insecte.....	10
1.5.2. Interaction de la toxine avec la membrane intestinale.....	11
1.5.2.1. La membrane péritrophique.....	11
1.5.2.2. Les récepteurs	11
1.5.2.3. Fixation aux récepteurs.....	13
1.5.3. Insertion de la toxine dans la membrane et formation de pores	15
1.5.3.1. Le modèle en parapluie et le modèle en canif.....	15
1.6. Oligomérisation	22
1.7. Structure des pores	23
1.8. Propriétés biophysiques des pores.....	26
1.8.1. Pores formés dans des bicouches lipidiques planes en absence de récepteurs.....	26
1.8.2. Pores formés dans des bicouches lipidiques planes en présence de récepteurs.....	27

1.8.3. Pores formés dans des cellules en culture.....	29
1.8.4. Pores formés dans des vésicules de la membrane à bordure en brosse ..	30
1.8.5. Taille des pores.....	31
1.8.5.1. Détermination de la taille des pores à partir de leur conductance.....	31
1.8.5.2. Détermination de la taille des pores à partir de celle des solutés perméants	31
1.8.5.3. Détermination de la taille des pores à partir de celle des solutés non chargés imperméants dans les expériences de bicouches lipidiques planes.....	32
1.9. Facteurs physico-chimiques influençant l'activité des toxines	33
1.10. Conclusion.....	36
Travaux de recherche	37
Avant-propos.....	37
Chapitre 2. Matériel et méthodes	40
2.1. Préparation des vésicules membranaires	40
2.2. Préparation des toxines.....	41
2.3. Mesures de gonflement osmotique.....	41
2.4. Mesures utilisant une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire	43
2.5. Simulation des expériences de gonflement osmotique.....	44
Résultats	46
Contribution des auteurs	46
Chapitre 3. Amino Acid and Divalent Ion Permeability of the Pores Formed by the <i>Bacillus thuringiensis</i> Toxins Cry1Aa and Cry1Ac in Insect Midgut Brush Border Membrane Vesicles	48
Résumé	48
Abstract	50
1. Introduction	51
2. Materials and methods.....	52
2.1. Preparation of toxins and brush border membrane vesicles	52

2.2. Light-scattering assay	52
3. Results and discussion.....	53
3.1. Membrane permeability to amino acids	53
3.2. Are amino acid symporters toxin receptors?	55
3.3. Membrane permeability to divalent cations and anions	55
3.4. Ion selectivity of the pores.....	57
Acknowledgements	57
References	58
Figure legends	64
Accord des coauteurs.....	70
Permission de l'éditeur.....	71
Chapitre 4. Analysis of the Properties of <i>Bacillus thuringiensis</i> Insecticidal	
Toxins Using a Potential-sensitive Fluorescent Probe.....	72
Résumé	72
Abstract	74
Introduction	75
Materials and methods.....	76
Preparation of membrane vesicles	76
Toxins	76
Fluorescence measurements	76
Results	77
Fluorescence measurements are influenced by pH and ionic strength	77
Membrane permeability to ions other than K^+	78
Relationship between fluorescence and K^+ transmembrane gradient.....	79
Effect of <i>B. thuringiensis</i> toxins	80
Discussion	81
References	86
Figure legends	93
Accord des coauteurs.....	100
Permission de l'éditeur.....	101

Chapitre 5. Protease Inhibitors Fail to Prevent Pore Formation by the Activated <i>Bacillus thuringiensis</i> Toxin Cry1Aa in Insect Brush Border Membrane Vesicles	102
Résumé	102
Abstract	104
Introduction	105
Materials and methods.....	106
Chemicals	106
Preparation of membrane vesicles	107
Toxins	107
Light-scattering assay	107
Data analysis.....	108
Results	109
Effect of various protease inhibitors on the pore-forming activity of Cry1Aa.....	109
Effect of PMSF on the pore-forming activity of Cry1 toxins.....	111
Effect of EDTA and EGTA on the pore-forming activity of Cry1 toxins.....	112
Discussion	113
Acknowledgments	117
References	118
Figure legends	131
Accord des coauteurs.....	140
Permission de l'éditeur	141
Chapitre 6. A Mechanical Force Contributes to the "Osmotic Swelling" of Brush Border Membrane Vesicles.....	142
Résumé	142
Abstract	144
Introduction	145
Materials and methods.....	146
Preparation of membrane vesicles	146
Toxin.....	147

Light-scattering assay	147
Data analysis	148
Osmotic swelling simulations	149
Results and discussion	150
Membrane permeability induced by the <i>B. thuringiensis</i> toxin Cry1Ac	150
Relation between vesicle volume and scattered light intensity	150
Simulation of volume changes	153
Effect of the buffer permeability of the pores formed by Cry1Ac on vesicle swelling.....	156
Re-swelling in the presence of the same solute inside and outside the vesicles.....	156
Origin of the restoration force	158
Conclusion.....	160
References	162
Figure legends	168
Accord des coauteurs.....	182
Permission de l'éditeur	183
Chapitre 7. Discussion générale.....	184
7.1. Sélectivité ionique des pores formés par les toxines.....	185
7.2. Étude de l'activité des toxines avec une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire.....	187
7.3. Influence des protéases intestinales sur l'activité des toxines.....	190
7.4. Modèle séquentiel de formation des pores	193
7.5. Cinétique de gonflement osmotique des vésicules.....	193
Chapitre 8. Perspectives et conclusions	195
8.1. Étude de l'importance relative des différents récepteurs dans le mode d'action des toxines.....	195
8.2. Force mécanique à l'origine du gonflement des vésicules de membrane à bordure en brosse.....	197
8.3. Conclusions	198

Références	200
Curriculum vitae.....	xxi

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 5.

Table 1. Effect of protease inhibitors on the pore-forming activity of Cry1Aa	126
Table 2. Effect of PMSF on the activity of Cry1 toxins.....	127
Table 3. Effect of overnight incubation of Cry1Aa and brush border membrane vesicles with ethanol and PMSF	128
Table 4. Reversibility of the effect of EDTA by an excess of divalent cations ...	129
Table 5. Effect of EDTA on the activity of Cry1 toxins	130

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1.

Figure 1. Structure des toxines Cry1Aa et Cyt2Aa et d'une protéine de 26 kDa provenant de <i>B. thuringiensis</i>	8
Figure 2. Modèles d'insertion des toxines de <i>B. thuringiensis</i> dans la membrane plasmique des insectes	17
Figure 3. Modèle d'un canal formé par la Cry1Aa	25

Chapitre 3.

Figure 1. Osmotic swelling of <i>M. sexta</i> midgut brush border membrane vesicles induced by Cry1Ac in the presence of aspartate and leucine.....	66
Figure 2. Permeability of the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac to amino acids	67
Figure 3. Permeability of the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac to divalent cations	68
Figure 4. Permeability of the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac to divalent anions.....	69

Chapitre 4.

Figure 1. Effect of ionic strength	95
Figure 2. Effect of valinomycin	96
Figure 3. Calibration of fluorescence as a function of the transmembrane potassium concentration ratio	97
Figure 4. Effects of <i>B. thuringiensis</i> toxins on the membrane potential of <i>M. sexta</i> brush border membrane vesicles	98
Figure 5. Effects of <i>B. thuringiensis</i> toxins on the membrane potential generated by a K^+ gradient in the presence of valinomycin	99

Chapitre 5.

Figure 1. Osmotic swelling of <i>M. sexta</i> midgut brush border membrane vesicles induced by various concentrations of Cry1Aa	133
Figure 2. Osmotic swelling of midgut brush border membrane vesicles induced by Cry1Aa in the presence of PMSF and EDTA	134
Figure 3. Effect of PMSF concentration on the rate of pore formation by Cry1Aa in brush border membrane vesicles.....	135
Figure 4. Effect of PMSF on the rate of pore formation by Cry1Aa	136
Figure 5. Effect of PMSF additions during incubation of the vesicles with Cry1Aa.....	137
Figure 6. Effect of EDTA and EGTA on the rate of pore formation by Cry1Aa.....	138
Figure 7. Effect of EDTA and EGTA additions during incubation of the vesicles with Cry1Aa	139

Chapitre 6.

Figure 1. Permeability of the pores formed by Cry1Ac to KCl and to sucrose in <i>M. sexta</i> midgut brush border membrane vesicles.....	172
Figure 2. Relation between scattered light intensity and volume of <i>M. sexta</i> vesicles.....	173
Figure 3. Permeability of <i>M. sexta</i> vesicles to KSCN in the presence of various concentrations of valinomycin.....	174
Figure 4. Variations in the volume of the vesicles predicted by the mathematical model	175
Figure 5. Permeability of the pores formed by Cry1Ac to Tris-citrate and to water.....	176
Figure 6. Effect of buffer composition on apparent membrane permeability to KCl.....	177

Figure 7. Changes in the volume of vesicles exposed to the same solute on both sides of the membrane	178
Figure 8. Theoretical relation between the volume of the vesicles and the ratio of the osmolarities inside and outside of the vesicles in the presence of a mechanical force and in the absence of toxin.....	179
Figure 9. Comparison of the osmotic swelling of <i>M. sexta</i> brush border membrane vesicles and rat liver microsomes	180
Figure 10. Osmotic swelling of <i>M. sexta</i> and rabbit intestinal brush border membrane vesicles	181

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AEBSF	fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyl
CAPS	3-cyclohexylamino-1-propanesulfonate
diS-C ₃ (5)	iodure de 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine
E-64	<i>trans</i> -epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane
EDTA	éthylènediaminetétraacétate
EGTA	éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétraacétate
EtOH	ethanol
FQRNT	Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GÉPROM	Groupe d'étude des protéines membranaires
Glu	gluconate
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GRTM	Groupe de recherche en transport membranaire
Hepes	N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonate)
KGlu	gluconate de potassium
KSCN	thiocyanate de potassium
MTSES	(2-sulfonatoéthyl)méthanethiosulfonate de sodium
NMDG	N-méthyle-D-glucamine
NMDGCl	chlorure de N-méthyle-D-glucamine
NMDGGlu	gluconate de N-méthyle-D-glucamine
pCMB	4-chloromercuribenzoate
pHMB	<i>p</i> -hydroxymercuribenzoate
PEG	polyéthylène glycol
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
RET	resonance energy transfer
SEM	standard error of the mean
TLCK	<i>N-p</i> -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone
TPCK	<i>N-p</i> -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
TMACl	tetramethylammonium chloride

TMAOH	tetramethylammonium hydroxide
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Val	valinomycin
Vip	vegetative insecticidal protein

À ma conjointe Marie-Claude Trudel
et
à mes parents Francine et André

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Raynald Laprade pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Dès mon arrivée au laboratoire le Professeur Laprade et son assistant, le Dr Vincent Vachon, ont fait en sorte que je me sente chez moi. Je les remercie pour les judicieux conseils qu'ils m'ont donnés au cours des sept années que j'ai passées avec eux. Ils m'ont aidé à réaliser un rêve. Je tiens à souligner le dévouement du Professeur Laprade et la grande disponibilité et la patience du Dr Vachon. Je remercie le Professeur Jean-Louis Schwartz pour sa collaboration. Les Professeurs Laprade et Schwartz m'ont aussi donné l'occasion de participer à de nombreux congrès internationaux.

Je remercie mes collaborateurs : Professeur Alfred Berteloot, Mélanie Fortier, Frédéric Girard, Jean-François Noël, Delphine Quievy, Sébastien Rivest et Marie-Claude Trudel. J'ai apprécié leur disponibilité, leur talent et leur rigueur.

Je remercie Lucie Marceau pour la production des toxines et pour m'avoir aidé à préparer les vésicules de membrane à bordure en brosse d'insectes et à réaliser certaines expériences, Marc Juteau pour la production des toxines et Mireille Marsolais pour la gestion quotidienne du matériel du laboratoire et, conjointement avec Léna Potvin, pour s'être occupée de l'élevage des insectes. Je remercie aussi Sandra Da Cal pour la préparation des microsomes et pour m'avoir aidé à préparer les vésicules de membrane à bordure en brosse de lapin, et Michel Brunet pour l'entretien et la réparation des appareils.

Je remercie mon amie Mélanie Fortier pour son aide et pour son sourire qui réussit toujours à égayer les moments difficiles. Je tiens à souligner son esprit critique.

Je remercie tous les professeurs du Groupe d'étude des protéines membranaires pour avoir participé à l'enrichissement de ma formation académique, ainsi que mes collègues Jean-Frédéric Brunet, Dominique Gagnon et Le Binh Tran pour leurs encouragements.

Finalement, je remercie ma conjointe, Marie-Claude Trudel, et mes parents, Francine Bissonnette Kirouac et André Kirouac, pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés grâce au soutien financier des organismes suivants :

- Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada ;
- Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) ;
- Valorisation-Recherche Québec ;
- Groupe de recherche en transport membranaire (GRTM) ;
- Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM) ;
- Réseau biocontrôle ;
- Réseau québécois de recherche en phytoprotection.

Je remercie le FQRNT, le GRTM, le GÉPROM et la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour les bourses d'étude reçues.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Les insecticides de synthèse (chimiques), massivement utilisés depuis plus de 50 ans, ont mené à l'apparition de nombreux effets secondaires sur l'environnement, les plus sévères étant leur toxicité pour la faune non ciblée, leur accumulation dans l'environnement, leur concentration dans la chaîne alimentaire, la contamination des cours d'eau et l'apparition d'insectes nuisibles résistants (Forsberg, 1977 ; Côté, 1998 ; Frutos *et al.*, 1999). Dans un contexte d'agriculture durable, et afin d'assurer la protection de l'environnement, la demande pour des substituts est devenue de plus en plus pressante. L'utilisation de produits biologiques à base de micro-organismes pathogènes tels que les virus, les champignons et les bactéries offre une solution de remplacement durable. Jusqu'à ce jour, le bioinsecticide ayant connu le plus de succès est le bacille de Thuringe (*Bacillus thuringiensis*). Cette bactérie produit une variété de protéines (appelées endotoxines- δ) possédant des propriétés insecticides spécifiques. Ce bioinsecticide, par sa spécificité et sa sécurité pour l'environnement, répond aux besoins écologiques actuels (Rajamohan *et al.*, 1998 ; Schnepf *et al.*, 1998 ; Fortier et Kirouac, 2000 ; Whalon et Wingerd, 2003). Certaines toxines de *B. thuringiensis* peuvent aussi être actives contre un certain nombre de nématodes (Wei *et al.*, 2003), de mites et de protozoaires (Feitelson *et al.*, 1992). D'autres, appelées parasporines, ont une activité cytotoxique envers des cellules cancéreuses, ce qui pourrait éventuellement mener à une utilisation médicale des toxines de *B. thuringiensis* (Mizuki *et al.*, 1999, 2000).

B. thuringiensis est une bactérie aérobie, à Gram positif et en forme de bâtonnet qui produit une spore lorsque son environnement lui est défavorable. On la retrouve de façon indigène dans plusieurs habitats à travers le monde : le sol, les cadavres d'insectes, la poussière accumulée sur des produits entreposés ainsi que le feuillage (Schnepf *et al.*, 1998). Le bacille de Thuringe fut identifié pour la première fois par le biologiste japonais Ishiwata (1901, cité par Lambert et Peferoen, 1992) comme pathogène du ver à soie (*Bombyx mori*). On doit le nom *Bacillus thuringiensis* au biologiste allemand Berliner (1911, cité par Lambert et Peferoen, 1992) qui l'utilisa pour décrire une bactérie pathogène qu'il isola de la chrysalide de la mouche méditerranéenne de la farine

(*Ephestia kuehniella*) et de larves d'insectes vivant dans des entrepôts de grains de la région de Thuringe en Allemagne. Hannay (1953) remarqua la formation d'un cristal parasporal lors de la sporulation et suggéra un lien possible entre ces cristaux et la toxicité de *B. thuringiensis*. Angus (1956a,b) conclut que le cristal, soluble en milieu basique, contient des protéines toxiques qui ont des propriétés insecticides. Il est maintenant bien connu que les cristaux, une fois solubilisés dans l'intestin de l'insecte, libèrent les protoxines qui sont ensuite transformées en toxines actives par les protéases intestinales. Les toxines actives agissent en formant des pores après s'être fixées à des récepteurs spécifiques situés sur la membrane luminale de l'épithélium intestinal. Ces pores perméabilisent la membrane à bordure en brosse, ce qui cause la mort des cellules intestinales et, par la suite, celle de l'insecte (Knowles et Dow, 1993 ; Rajamohan *et al.*, 1998 ; Schnepf *et al.*, 1998 ; Vachon *et al.*, 2004b).

1.1. Utilisation de *B. thuringiensis* comme bioinsecticide

Les scientifiques ont commencé à entrevoir l'utilisation de *B. thuringiensis* pour le contrôle biologique des insectes nuisibles environ dix ans après sa première identification par Ishiwata. La première production commerciale eut lieu en France à la fin des années 1930 sous le nom de *Sporeine*. Plusieurs formulations de *B. thuringiensis* furent commercialisées avec peu de succès dans les années 1960. Ce ne fut qu'après la découverte par Dulmage (1970) d'une souche beaucoup plus active (*kurstaki* HD-1, active contre les lépidoptères) que l'on commença à utiliser *B. thuringiensis* en agriculture. Cette souche fut commercialisée en 1970 sous le nom de *Dipel* par les laboratoires Abbott (Lambert et Peferoen, 1992 ; Cannon, 1993) et elle constitue encore l'ingrédient actif de la plupart des bioinsecticides commerciaux à base de *B. thuringiensis* (Côté, 1998).

Jusqu'à la fin des années 1970, on croyait que *B. thuringiensis* était efficace seulement contre les lépidoptères. Goldberg et Margalit (1977) isolèrent alors la souche *israelensis* active contre les diptères, très toxique pour les moustiques et les larves de mouches noires. Par la suite, Krieg *et al.* (1983, cité par Lambert et Peferoen, 1992) isolèrent la souche *tenebrionis* active contre les coléoptères, notamment la larve du doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata*). Ces deux découvertes

stimulèrent la mise sur pied de programmes de recherche de nouvelles souches de *B. thuringiensis* actives contre d'autres insectes ayant des répercussions économiques importantes ; elles stimulèrent aussi la naissance, dans les années 1980, de nouvelles compagnies œuvrant dans le domaine des biotechnologies (Lambert et Peferoen, 1992).

Les insecticides ne sont pas réservés uniquement à l'agriculture ; ils sont aussi employés en foresterie et en santé publique. Dans les années 1970, les administrations publiques canadiennes ont commencé à s'apercevoir que les insecticides de synthèse utilisés en foresterie, notamment pour contrôler la tordeuse des bourgeons de l'épinette, pouvaient être dommageables pour l'environnement. Ces insecticides nuisent aux insectes utiles comme les pollinisateurs et déséquilibrent les chaînes alimentaires aquatiques, ce qui met en danger, entre autres, la survie des jeunes saumons qui se nourrissent d'insectes (Forsberg, 1977). La demande pour des substituts aux insecticides de synthèse est ainsi devenue de plus en plus grande. Au Canada, *B. thuringiensis* est maintenant utilisé à grande échelle en foresterie, entre autres, pour le contrôle de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et de la spongieuse (Côté, 1998 ; Service canadien des forêts, 1999 ; SOPFIM, 2006). *B. thuringiensis* est aussi employé pour le contrôle des moustiques et des mouches noires dans les zones de forte nuisance, pour lutter contre le virus du Nil occidental (Boisvert et Lacoursière, 2004 ; SOPFIM, 2006) et, dans les pays tropicaux, pour le contrôle d'insectes vecteurs de maladies telles que le paludisme (malaria) et la cécité des rivières (onchocercose) (Federici, 1995).

B. thuringiensis est le bioinsecticide le plus utilisé et un large éventail de produits est présentement disponible pour contrôler de nombreux insectes ravageurs (Lambert et Peferoen, 1992 ; Schnepf *et al.* 1998 ; Whalon et Wingerd, 2003). Ce bioinsecticide occupe néanmoins une faible part (moins de 2% en 1999) du marché mondial des insecticides (Shelton *et al.*, 2002). Depuis 1995, une solution de rechange à l'épandage d'insecticides s'offre aux producteurs agricoles ; il s'agit des plantes transgéniques dans lesquelles on a incorporé un gène codant pour une toxine de *B. thuringiensis*. Les plantes ainsi modifiées produisent leur propre insecticide. Quatre plantes transgéniques résistantes aux insectes ont été commercialisées entre 1995 et 2001 : le coton, le maïs, la tomate et la pomme de terre (Frutos *et al.*, 1999 ; Shelton *et al.*, 2002). Même si ces quatre plantes sont approuvées au Canada, pour des raisons climatiques ou de marché,

seul le maïs est présentement cultivé (Communication-Québec, 2006). Les plantes transgéniques ont donné un nouvel essor au bacille de Thuringe ; la culture mondiale de coton et de maïs transgéniques s'étendait sur un total de 22.5 millions d'hectares en 2004, ce qui représente une hausse d'approximativement 25% par rapport à l'année précédente (James, 2004). Par contre, la pomme de terre transgénique, mise en marché en 1996, n'a pas connu un tel succès à cause de l'inquiétude des consommateurs face aux organismes modifiés génétiquement et à la disponibilité d'un insecticide de synthèse efficace (l'imidacloprid) ; elle a été retirée du marché en 2001 (Shelton *et al.*, 2002). Malgré les questionnements qu'elles suscitent aujourd'hui, les plantes transgéniques seront probablement de plus en plus répandues. Elles ont l'avantage d'être protégées pendant toute la saison, indépendamment des conditions météorologiques, et de permettre le contrôle d'insectes qui sont difficiles à atteindre par l'épandage d'insecticides pulvérisés (Kumar *et al.*, 1996). Plusieurs plantes transgéniques à base de *B. thuringiensis* sont en attente d'approbation (Frutos *et al.*, 1999 ; Shelton *et al.*, 2002), et des arbres transgéniques, résistants notamment à la tordeuse des bourgeons de l'épinette, sont à l'étude (Séguin, 2000 ; Peña et Séguin, 2001).

La spécificité des toxines permet de cibler un insecte nuisible sans nuire aux insectes utiles, ce qui permet d'incorporer les produits à base de *B. thuringiensis* dans les programmes de lutte intégrée (Schnepf *et al.*, 1998 ; Romeis *et al.*, 2006). De plus, les toxines insecticides de *B. thuringiensis* n'ont pas d'activité chez les mammifères, les oiseaux et les poissons puisqu'elles ont besoin d'un récepteur spécifique pour s'insérer efficacement dans la membrane (Cannon, 1993 ; Schnepf *et al.*, 1998). Ceci les rend particulièrement attrayantes dans le développement d'insecticides sécuritaires et respectueux de l'environnement. Les produits insecticides à base de *B. thuringiensis* présentement utilisés sont sans danger pour les vertébrés à des doses des centaines de fois plus élevées que celles pouvant potentiellement être rencontrées lorsque ces produits sont utilisés selon les recommandations des fabricants. Seulement deux cas d'infection causée par *B. thuringiensis* ont été documentées chez l'homme entre 1997 et 2001, et les personnes infectées avaient subi des blessures les prédisposant à l'infection (Siegel, 2001). Au Québec, entre 1996 et 2000, aucune infection à *B. thuringiensis* n'a pu être clairement identifiée dans le cadre d'un programme de surveillance du Laboratoire de

santé public, et, à la lumière des résultats obtenus, le programme fut arrêté à la fin de l'année 2000 (Lorange, 2000). Quarante ans d'utilisation de *B. thuringiensis* se soldent par un dossier de sécurité sans égal.

1.2. Classification et nomenclature des toxines de *B. thuringiensis*

On estime qu'il y a environ 40 000 souches de *B. thuringiensis* répertoriées dans des collections publiques et privées (Lambert et Peferoen, 1992). Chaque souche produit une ou plusieurs endotoxines- δ . Il fut donc nécessaire d'élaborer un système permettant leur classification. Höfte et Whiteley (1989) proposèrent une classification des toxines de *B. thuringiensis* fondée sur leur spectre d'activité ainsi que sur le degré d'homologie de leur séquence d'acides aminés. Dans cette classification, la majorité des toxines contenues dans l'inclusion cristalline sont des protéines de type « Cry » très spécifiques pour les cellules d'insectes, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Certaines toxines cristallines de *B. thuringiensis* ont, *in vitro*, un large spectre d'activité cytolytique et, *in vivo*, une activité spécifique pour les diptères ; elles sont appelées « Cyt ». Il est rapidement devenu difficile de classer des toxines très homologues qui sont actives contre des espèces différentes et, inversement, des toxines très peu homologues qui ont une activité insecticide semblable. Cette classification fut donc révisée par Crickmore *et al.* (1998). Dans la nouvelle classification, les toxines sont nommées uniquement selon le degré d'identité de leur séquence d'acides aminés. Les protéines nommées Cyt dans l'ancienne nomenclature ont été renommées Cyt dans la nouvelle. Une protéine Cry est définie comme une protéine cristalline que l'on retrouve dans une inclusion parasporale et qui possède une toxicité vérifiable pour un organisme en particulier ou ayant, de façon évidente, une séquence d'acides aminés similaire à celle d'une protéine Cry connue. De façon similaire, Cyt désigne une protéine cristalline ayant une activité hémolytique ou toute autre protéine ayant, de façon évidente, une séquence d'acides aminés similaire à celle d'une protéine Cyt connue. Chaque toxine a un nom unique comprenant quatre rangs identifiés par un chiffre, une lettre majuscule, une lettre minuscule et un autre chiffre. Par exemple, une toxine complètement nouvelle contenue dans une inclusion cristalline pourrait maintenant s'appeler Cry51Aa1 (Crickmore *et al.*, 2006). On attribue un nouveau rang primaire lorsqu'une toxine possède moins de 45% d'identité avec les

séquences d'acides aminés des autres toxines connues, un nouveau rang secondaire entre 45 et 78% d'identité et un nouveau rang tertiaire entre 78 et 95% d'identité. Le rang quaternaire, qui distingue les toxines qui sont identiques à plus de 95%, est optionnel (Crickmore *et al.*, 1998, 2006). L'utilisation de cette nouvelle classification est maintenant la norme et, en faisant abstraction du rang quaternaire, 145 toxines Cry et 9 toxines Cyt étaient répertoriées au mois de mai 2006 (Crickmore *et al.* 2006). Notons que plusieurs toxines nommées CryI, CryII, CryIII et CryIV dans l'ancienne nomenclature ont été renommées respectivement Cry1, Cry2, Cry3 et Cry4 dans la nouvelle. Donc, même si les toxines ne sont plus classifiées selon leur spectre d'activité, on peut considérer les toxines Cry1 comme étant principalement actives contre les lépidoptères, les Cry2 contre les lépidoptères et les diptères, les Cry3 contre les coléoptères, et les Cry4 contre les diptères.

Certaines protéines insecticides non reliées à la famille des Cry et produites pendant la croissance végétative de certaines souches de *B. thuringiensis* ont été appelées Vip (*Vegetative insecticidal protein*) (Estruch *et al.*, 1996), et il a été proposé de les classer de façon similaire aux protéines Cry (Crickmore *et al.*, 2006). L'appellation Vip n'est cependant pas un très bon choix car certaines protéines Cry sont produites non seulement pendant la phase stationnaire et pendant la sporulation mais aussi pendant la phase végétative de la bactérie, notamment la Cry3Aa (Schnepf *et al.*, 1998).

1.3. Structure des toxines

Les structures des toxines Cry1Aa (Figure 1 A et B) (Grochulski *et al.*, 1995), Cry1Ac (Li *et al.*, 2001), Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), Cry3Bb (Galitsky *et al.*, 2001), Cry4Aa (Boonserm *et al.*, 2006), Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005) et Cyt2Aa (anciennement nommée CytB) (Figure 1 C) (Li *et al.*, 1996) ont été déterminées par cristallographie et diffraction des rayons X. Bien que certaines de ces toxines Cry partagent seulement une faible identité de séquence d'acides aminés – par exemple, 36% entre la Cry3Aa et la Cry1Aa (Schnepf *et al.*, 1998), 20% entre la Cry3Aa et la Cry2Aa et 17% entre la Cry1Aa et la Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001) – elles ont toutes une structure tertiaire similaire composée de trois domaines distincts (Figure 1 A). Le

domaine I, situé dans la partie N-terminale, est constitué de 7 hélices α dont l'hélice 5 qui est entourée par les autres hélices (Figure 1 B). Le domaine II est formé de trois feuillets β en configuration de clef grecque et le domaine III, situé dans la partie C-terminale, est constitué de deux feuillets β antiparallèles disposés en sandwich β . La ressemblance entre les structures élucidées permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle plusieurs toxines Cry ayant un rang primaire différent ont un mode d'action similaire. La Cyt2Aa possède un seul domaine formé majoritairement de feuillets β (Figure 1 C) (Li *et al.*, 1996). Notons que l'hypothèse selon laquelle les toxines Cyt agissent en formant des pores a récemment été remise en question par Butko (2003) et Manceva *et al.* (2005) qui proposent plutôt un effet détergent.

La structure d'une protéine de 26 kDa provenant d'une digestion à la protéinase K d'une inclusion parasporale de *B. thuringiensis* a aussi été résolue (Figure 1 D) (Akiba *et al.*, 2006). Cette protéine est principalement formée de feuillets β . Sa structure est très différente de celle des autres toxines Cry élucidées (Figure 1 A) et de celle de la Cyt2Aa (Figure 1 C) ; elle ressemble d'avantage à celle de la toxine ϵ de *Clostridium perfringens* (Cole *et al.*, 2004). L'importance de cette structure vient du degré d'identité de la séquence de cette protéine avec celle de la parasporine Cry45Aa (38%). De plus, cette toxine partage une identité de séquence de 26.5% avec la Cry23Aa, de 23.5% avec la Cry15Aa et de 22.5% avec la Cry33Aa (Akiba *et al.*, 2006). Vu leur ressemblance, ces protéines ont probablement une structure similaire.

Il semble donc que certaines toxines Cry aient une structure très différente de celles connues jusqu'à maintenant, ce qui met en lumière un autre problème au niveau de leur classification. Ceci n'est cependant pas surprenant puisqu'il n'y a aucun pourcentage d'identité minimal requis pour classer une nouvelle toxine dans la famille des Cry. Dans la nomenclature actuelle, il y a donc, non seulement un problème avec l'appellation Vip (voir section 1.2.), mais aussi avec l'hétérogénéité structurale des toxines Cry. Il est aussi surprenant que des toxines ayant une séquence d'acides aminés identiques mais ayant été isolées indépendamment puissent être nommées avec un rang quaternaire différent. Depuis la dernière révision de la nomenclature en 1998 de nombreuses toxines ont été séquencées et nommées, et il est probablement temps de revoir à nouveau les critères de classification des toxines produites par *B. thuringiensis*.

La nouvelle classification devrait regrouper en familles distinctes les toxines ayant entre elles une structure potentiellement semblable.

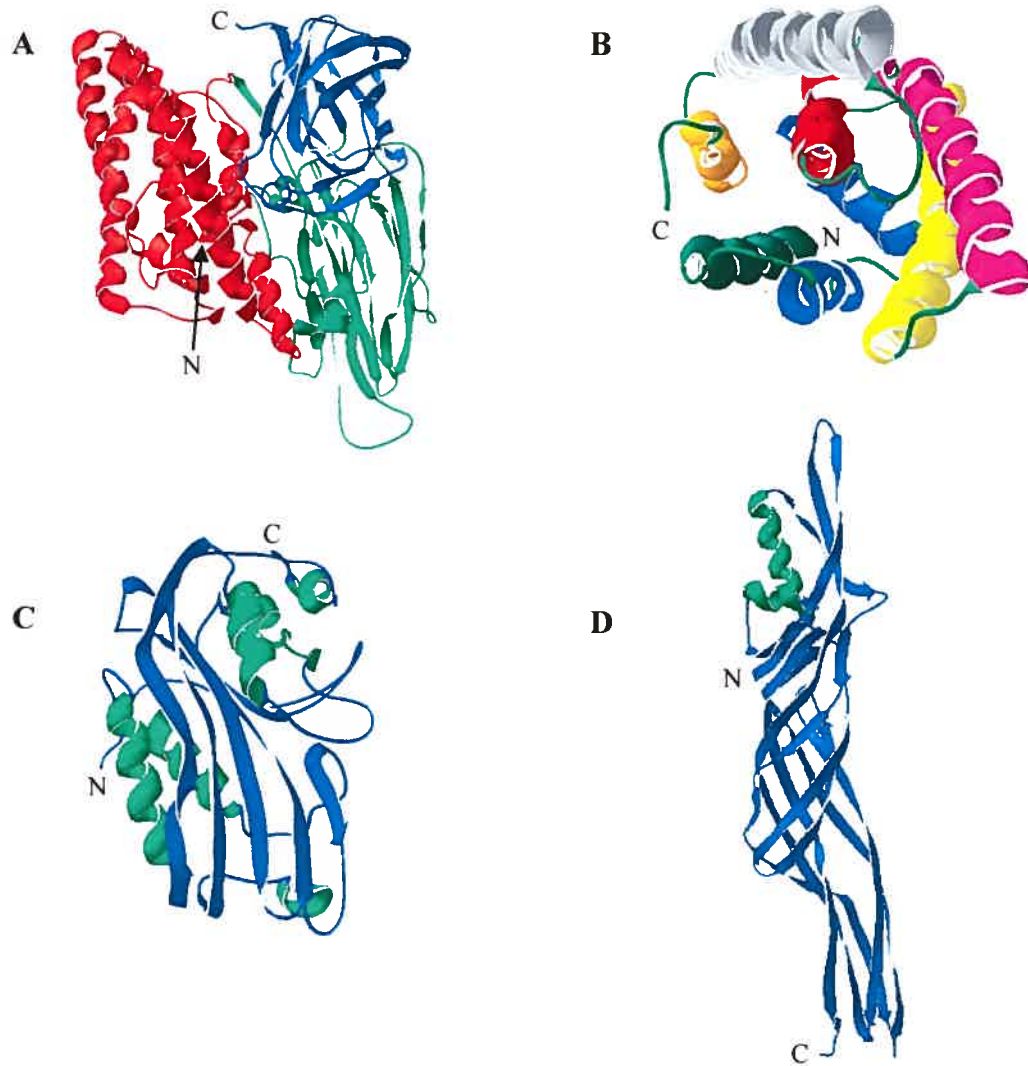


Figure 1. Structure des toxines Cry1Aa et Cyt2Aa et d'une protéine de 26 kDa provenant de *B. thuringiensis*.

(A) Domaines I (rouge), II (vert) et III (bleu) de la Cry1Aa. (B) Domaine I de la Cry1Aa (l'hélice $\alpha 5$, en rouge, est entourée des autres hélices). (C) Structure de la Cyt2Aa (les hélices α sont en vert). (D) Structure d'une protéine parasporale de 26 kDa ressemblant à la Cry45Aa. Les structures ont été déterminées par cristallographie et diffraction des rayons X par Grochulski *et al.* (1995) (Cry1Aa), Li *et al.* (1996) (Cyt2Aa) et Akiba *et al.* (2006) (protéine de 26 kDa). Elles ont été analysées et présentées à l'aide du logiciel Swiss PDB Viewer (v3.7) (Guex et Peitsch, 1997).

1.4. La cible des toxines insecticides : l'intestin moyen de l'insecte

Le mode d'action des toxines insecticides de *B. thuringiensis* a beaucoup été étudié chez les larves des lépidoptères, entre autres chez le sphinx du tabac (*Manduca sexta*) (Knowles, 1994 ; Tran, 2000). La chenille passe par 5 ou 6 stades larvaires avant de former une chrysalide d'où émergera un papillon. Chaque stade est séparé du précédent par une mue. Le papillon se nourrit généralement d'aliments liquides, et son rôle principal est la reproduction. Par contre, la larve est phytophage ; c'est donc elle qui est dommageable pour les récoltes (Borror et White, 1991 ; Laplante, 1998). Le tube digestif de la larve est habituellement divisé en trois régions : l'intestin antérieur, l'intestin moyen et l'intestin postérieur. L'épithélium de l'intestin moyen est composé d'une seule couche de cellules qui repose sur une membrane basale. Il comprend deux types de cellules : les cellules en colonne (les plus abondantes) et les cellules en gobelet (Cioffi, 1979 ; Dow, 1986 ; Knowles, 1994). Ces deux types de cellules sont reliés par des jonctions serrées et par des jonctions communicantes (Lane et Skaer, 1980 ; Lane *et al.*, 1989). Les jonctions communicantes permettent les échanges chimiques et électriques entre les cellules (Dow et Peacock, 1989). La membrane apicale des cellules en colonne, aussi appelée membrane à bordure en brosse, est constituée de microvillosités, et c'est au niveau de cette membrane que les toxines se fixent, s'insèrent et forment des pores (Bravo *et al.*, 1992a ; Knowles, 1994 ; Peyronnet *et al.*, 1997). Une membrane péritrophique composée principalement de chitine et de glycoprotéines sépare l'épithélium intestinal et le contenu de l'intestin (Richards et Richards, 1977 ; Adang et Spence, 1981 ; Barbehenn et Martin, 1995).

Le pH de la lumière de l'intestin moyen des lépidoptères est très élevé : il varie de 8 à plus de 12 selon l'espèce et la région de l'intestin moyen (Dow, 1984, 1992). La membrane luminale des cellules épithéliales est caractérisée par un fort potentiel membranaire (Dow et Peacock, 1989 ; Moffett et Koch, 1988) généré par une pompe à protons couplée à un échangeur $K^+/2H^+$ (Wieczorek, 1992 ; Azuma *et al.*, 1995). Le gradient d'ions K^+ ainsi généré permet l'absorption des acides aminés par l'intermédiaire de cotransporteurs K^+ /acides aminés situés dans la membrane apicale des cellules en colonne (Sacchi et Wolfersberger, 1996 ; Wolfersberger, 2000). Chez *M. sexta*, la concentration luminale des ions potassiques, mesurée par spectrométrie à

flamme, varie entre 190 ± 15 et 211 ± 11 mM selon la région de l'intestin (Dow et Harvey, 1988). Une fraction importante de ces ions semble cependant être liée puisque des mesures effectuées avec une électrode spécifique au potassium varient entre 80 ± 0.2 et 84 ± 1 mM (Dow et Harvey, 1988). Notons que la composition du milieu intestinal peut varier en fonction de la diète de l'insecte. Les principales protéases retrouvées dans l'intestin moyen des lépidoptères sont des protéases à sérine ressemblant principalement à des trypsines et à des chymotrypsines (Terra et Ferreira, 1994).

1.5. Mode d'action des toxines insecticides Cry chez les lépidoptères

Le mode d'action des toxines Cry de *B. thuringiensis* peut être divisé en trois grandes étapes : solubilisation et activation de la protoxine dans l'intestin moyen, fixation à un récepteur spécifique situé à la surface de la membrane à bordure en brosse et insertion de la toxine dans la membrane afin de former un pore transmembranaire qui abolit les gradients ioniques et cause la mort de l'insecte.

1.5.1. Solubilisation et activation de la protoxine dans l'intestin de l'insecte

Les cristaux formés par *B. thuringiensis* sont d'abord ingérés par la larve puis solubilisés dans l'intestin. Les protoxines ainsi libérées sont ensuite activées dans la lumière de l'intestin moyen par les protéases intestinales (Andrews *et al.*, 1985 ; Bietlot *et al.*, 1989 ; Choma *et al.*, 1990). Le pH très basique et les conditions réductrices de l'intestin moyen jouent un rôle important dans la solubilisation des cristaux et dans l'activation des toxines (Jaquet *et al.*, 1987 ; Bietlot *et al.*, 1990). Dans certains cas, l'hydrolyse de la protoxine peut aussi avoir lieu à l'intérieur de la cellule bactérienne pendant l'assemblage du cristal (Oppert, 1999 ; Rukmini *et al.*, 2000). La taille de la protoxine et de la toxine activée varient entre les différentes familles de toxines Cry. Pour les Cry1A, les protéases transforment la protoxine d'environ 130–160 kDa en une toxine active de 55–65 kDa (Schnepf *et al.*, 1998 ; Rukmini *et al.*, 2000). Lors de l'activation, les 28 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale et la moitié C-terminale de la protoxine sont éliminés (Bietlot *et al.*, 1989).

Li *et al.* (1991) ont suggéré que le domaine III pourrait assurer la stabilité de la toxine en la protégeant des protéases présentes dans l'intestin de l'insecte. Cependant, tous les domaines devraient jouer ce rôle (Schnepf *et al.*, 1998) et plusieurs mutations effectuées dans d'autres domaines déstabilisent la protéine. Par exemple, certaines mutations à l'intérieur des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ de la Cry1Ac (Manoj Kumar et Aronson, 1999) et l'abolition du pont salin Asp242–Arg265 entre les domaines I et II de la Cry1Aa (Coux *et al.*, 2001) rendent la toxine instable en présence de trypsine.

1.5.2. Interaction de la toxine avec la membrane intestinale

Une fois la toxine solubilisée, elle traverse la membrane péritrophique et se fixe à des récepteurs spécifiques situés à la surface luminale des cellules en colonne.

1.5.2.1. La membrane péritrophique

Les toxines peuvent se fixer à la membrane péritrophique mais cette fixation n'est pas corrélée à la toxicité (Bravo *et al.*, 1992a,b ; Knowles, 1994). Selon Yunovitz *et al.* (1986) la membrane péritrophique peut empêcher le passage d'agrégats de molécules de toxine. Il peut donc être tentant de supposer que cette membrane joue un rôle de défense contre les toxines de *B. thuringiensis* (Knowles, 1994), mais ceci n'a jamais été clairement démontré. Des chitinases peuvent agir en synergie avec *B. thuringiensis*, probablement en digérant la membrane péritrophique (Smirnov, 1974 ; Regev *et al.*, 1996 ; Ding *et al.*, 1998). Puisque cette membrane offre principalement une protection mécanique à l'intestin, il est concevable que les toxines de *B. thuringiensis* agissent plus efficacement sur un épithélium intestinal moins bien protégé de son environnement.

1.5.2.2. Les récepteurs

Plusieurs récepteurs potentiels des toxines ont été identifiés chez une variété de lépidoptères. Parmi ceux-ci, on retrouve plusieurs isoformes d'aminopeptidase N identifiées chez *M. sexta* (Knight *et al.*, 1994 ; Sangadala *et al.*, 1994 ; Knight *et al.*, 1995 ; Luo *et al.*, 1996 ; Denolf *et al.*, 1997 ; Luo *et al.*, 1999b), *Heliothis virescens* (Gill *et al.*, 1995 ; Luo *et al.*, 1997a ; Banks *et al.*, 2001, 2003), *Lymantria dispar*

(Valaitis *et al.*, 1995 ; Garner *et al.*, 1999), *B. mori* (Yaoi *et al.*, 1997 ; Hua *et al.*, 1998 ; Yaoi *et al.*, 1999) et *Plutella xylostella* (Denolf *et al.*, 1997 ; Luo *et al.*, 1997b). Ces enzymes sont fixées dans les membranes par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Des protéines ressemblant à des cadhérines ont aussi été identifiées comme récepteurs chez *M. sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1993, 1995) et *B. mori* (Nagamatsu *et al.*, 1998). Toutes ces protéines ont été purifiées, clonées et séquencées. Une glycoprotéine anionique qui fixe la Cry1Aa, la Cry1Ab et la Cry1Ac a été isolée à partir de la membrane à bordure en brosse de *L. dispar* (Valaitis *et al.*, 2001). Des phosphatases alcalines possédant une ancre GPI et fixant la Cry1Ac ont été identifiées chez *M. sexta* (McNall et Adang, 2003) et *H. virescens* (Jurat-Fuentes et Adang, 2004) et des glycolipides pouvant fixer la Cry1Aa, la Cry1Ab et la Cry1Ac ont été extraits de l'intestin moyen de *M. sexta* (Garczynski et Adang, 2000 ; Griffiths *et al.*, 2005). Il a aussi été suggéré que les cotransporteurs d'acides aminés, en particulier ceux de la leucine (Reuveni et Dunn, 1991 ; Giordana *et al.*, 1993 ; Parenti *et al.*, 1995 ; Leonardi *et al.*, 1997) et de l'histidine (Giordana *et al.*, 1993), pourraient agir comme récepteurs de la Cry1Aa (Giordana *et al.*, 1993 ; Parenti *et al.*, 1995 ; Leonardi *et al.*, 1997) et de la Cry1Ac (Reuveni et Dunn, 1991). Cette hypothèse fut cependant remise en question car la perméabilité des pores formés par la toxine pour ces acides aminés permet de réinterpréter les résultats de ces études (Kirouac *et al.*, 2002). Ceci sera traité en détail dans le Chapitre 3.

La formation de pores est possible, même en absence de récepteur, dans des bicouches lipidiques planes (Slatin *et al.*, 1990 ; Schwartz *et al.*, 1993 ; English *et al.*, 1994 ; Von Tersch *et al.*, 1994 ; Grochulski *et al.*, 1995 ; Racapé, 1997 ; Schwartz *et al.*, 1997a,b,c ; Peyronnet *et al.*, 2001, 2002 ; Rausell *et al.*, 2004) et des liposomes (Yunovitz et Yawetz, 1988 ; Butko *et al.*, 1994 ; Sangadala *et al.*, 1994 ; Luo *et al.*, 1997a ; Smedley *et al.*, 1997), mais à des concentrations de toxine relativement élevées. Des expériences utilisant des membranes lipidiques pures dans lesquelles certains récepteurs mentionnés plus haut ont été reconstitués tendent non seulement à confirmer que ces protéines agissent bien comme récepteurs des toxines mais aussi que les récepteurs jouent un rôle important dans le mode d'action de ces dernières. Les aminopeptidases de 120 kDa de *M. sexta* (Sangadala *et al.*, 1994) et de 170 kDa de *H.*

virescens (Luo *et al.*, 1997a) augmentent l'efflux de $^{86}\text{Rb}^+$ induit entre autres par la Cry1Ac dans des liposomes. La reconstitution de l'aminopeptidase de 120 kDa de *M. sexta* (Schwartz *et al.*, 1997b) ou l'incorporation de vésicules de la membrane à bordure en brosse purifiées à partir de *M. sexta* (Martin et Wolfersberger, 1995), de *Spodoptera frugiperda* (Lorence *et al.*, 1995) et de *L. dispar* (Peyronnet *et al.*, 2001) dans des bicouches lipidiques planes stimulent aussi la formation de pores par les toxines. De plus, des cellules Sf9, dérivées du tissu ovarien de *S. frugiperda*, qui expriment la cadhérine Bt-R175 de *B. mori* ont acquis une sensibilité à la Cry1Aa (Nagamatsu *et al.*, 1999), et, de façon similaire, des cellules High Five, dérivées du tissu ovarien de *Trichoplusia ni*, qui expriment la cadhérine Bt-R1 de *M. sexta*, ont acquis une sensibilité à la Cry1Ab (Zhang *et al.*, 2005).

1.5.2.3. Fixation aux récepteurs

La fixation de la toxine à la membrane s'effectue en deux étapes, une étape réversible qui correspond à la fixation de la toxine au récepteur (Hofmann *et al.* 1988a, b) et une étape irréversible qui correspond à l'insertion de la toxine dans la membrane (Van Rie *et al.*, 1989 ; Ihara *et al.*, 1993 ; Liang *et al.*, 1995 ; Rajamohan *et al.*, 1995). Le domaine I, situé dans la partie N-terminale de la toxine est généralement considéré comme étant responsable de la formation du pore. De nombreuses mutations ponctuelles dans le domaine I réduisent ou abolissent la toxicité de la protéine sans toutefois modifier de façon significative ses propriétés de fixation (Ahmad et Ellar, 1990 ; Wu et Aronson, 1992 ; Chen *et al.*, 1995 ; Hussain *et al.*, 1996). L'échange de fragments entre des toxines similaires a permis d'attribuer au domaine II un rôle majeur dans la spécificité de la toxine et sa fixation au récepteur (Ge *et al.*, 1989 ; Widner et Whiteley, 1990 ; Ge *et al.*, 1991 ; Lee *et al.*, 1992 ; Liang et Dean, 1994 ; Masson *et al.*, 1994 ; Tabashnik *et al.*, 1996). Plusieurs mutations ont aussi été effectuées au niveau des boucles du domaine II des toxines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca et Cry3Aa afin d'étudier leur rôle potentiel dans la fixation sur le récepteur. Rajamohan *et al.* (1998) et Schnepf *et al.* (1998) résument l'ensemble de ces travaux. La même mutation peut avoir des effets différents selon l'insecte ; la fixation du domaine II au récepteur est donc complexe. Les différents résultats suggèrent que toutes les boucles du domaine II

participent à la fixation au récepteur mais probablement pas toutes en même temps pour un insecte ou un récepteur donné. Notons aussi que différentes toxines peuvent avoir la même séquence d'acides aminés dans les boucles du domaine II (par exemple la Cry1Ab et la Cry1Ac) et se fixer à des récepteurs différents (Schnepf *et al.*, 1998). Le domaine III contribue aussi à la fixation au récepteur. Il semble jouer un rôle dans la spécificité de la Cry1Ac envers *H. virescens* (Schnepf *et al.*, 1990 ; Ge *et al.*, 1991) et *M. sexta* (Aronson *et al.*, 1995). Il contribue probablement aussi à la spécificité de la Cry1Ac envers les cellules Cf1 (Masson *et al.*, 1994) et dans la fixation de la Cry1Ab à la membrane intestinale de *Spodoptera exigua* (de Maagd *et al.*, 1996b). Notons aussi que des mutations dans une région hautement conservée du domaine III modifient la toxicité et la formation de pores (Chen *et al.*, 1993 ; Schwartz *et al.*, 1997c ; Wolfersberger *et al.*, 1996).

L'activité insecticide maximale requiert souvent la présence de séquences provenant des domaines II et III d'une toxine active (Schnepf *et al.*, 1990 ; Ge *et al.*, 1991 ; Honée *et al.*, 1991). L'échange du domaine III entre différentes toxines modifie souvent le spectre d'activité de la toxine et le choix du récepteur (Bosch *et al.*, 1994 ; Masson *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 1995 ; de Maagd *et al.*, 1996a,b). Les différents domaines semblent s'influencer mutuellement car des mutations à l'intérieur du domaine I modifient la fixation au récepteur (Wu et Aronson, 1992) et des mutations dans le domaine II changent la toxicité sans modifier la fixation (Rajamohan *et al.*, 1995 ; Smedley et Ellar, 1996). Lorsque les domaines I de deux toxines actives sont échangés, la chimère résultante n'est pas nécessairement fonctionnelle. Les propriétés des pores formés par des toxines chimériques semblent résulter d'une interaction entre les domaines I et II ou I et III. Les propriétés des chimères ne peuvent donc pas être simplement prédites d'après les propriétés des toxines de type sauvage à partir desquelles elles sont fabriquées (Rang *et al.*, 1999, 2001).

Des expériences de résonance plasmonique de surface (*surface plasmon resonance*) ont montré que la Cry1Ac se fixe à deux sites distincts sur l'aminopeptidase N de 115 kDa de *M. sexta* (qui provient de la forme de 120 kDa dont l'ancre GPI a été coupée) tandis que la Cry1Aa et la Cry1Ab se fixent sur un seul site. La fixation de la Cry1Ac aux deux sites sur le récepteur est inhibée par la N-acétyle-D-galactosamine

tandis que la fixation de la Cry1Aa et de la Cry1Ab n'est pas sensible à sa présence (Masson *et al.*, 1995, 2002). La N-acétyle-D-galactosamine est donc le groupement spécifiquement reconnu par la Cry1Ac sur le récepteur, et celle-ci a été cristallisée en sa présence (Derbyshire *et al.*, 2001). La structure du complexe a été résolue par analyse de la diffraction des rayons X et a permis d'identifier sept résidus à l'intérieur du domaine III qui forment le site de fixation (Li *et al.*, 2001).

1.5.3. Insertion de la toxine dans la membrane et formation de pores

Une fois fixée au récepteur, une toxine active s'insère dans la membrane et forme un pore. Les pores perméabilisent la membrane à bordure en brosse, ce qui abolit les gradients ioniques transmembranaires, cause la mort des cellules intestinales et, par la suite, celle de l'insecte (Knowles et Ellar, 1987 ; Carroll et Ellar, 1993 ; Peyronnet *et al.*, 1997).

La structure du domaine I, composée de longues hélices hydrophobes et amphipathiques, où l'hélice $\alpha 5$ est entourée des six autres hélices (Figure 1 B), suggère que c'est ce domaine qui s'insère dans la membrane et forme le pore. Les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2a$ et $\alpha 2b$ de la Cry1Aa ne sont cependant pas assez longues pour traverser la membrane (<14 acides aminés) tandis que les cinq autres hélices le sont (Grochulski *et al.*, 1995). De plus, des fragments de toxine correspondant au domaine I de la Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), la Cry1Ac (Walters *et al.*, 1993), la Cry3Aa (Schwartz et Laprade, 2000) et la Cry3Ba (Von Tersch *et al.*, 1994) et un peptide formé des hélices $\alpha 1$ à $\alpha 5$ de la Cry4Ba (Puntheeranurak *et al.*, 2004) forment des canaux ioniques dans des bicouches lipidiques planes.

1.5.3.1. Le modèle en parapluie et le modèle en canif

Le domaine I des toxines comporte plusieurs similarités avec les domaines responsables de la formation des pores chez d'autres toxines bactériennes comme la colicine A et la toxine diphtérique (Lesieur *et al.*, 1997 ; Schnepf *et al.*, 1998). Tout comme les toxines Cry dans leur forme soluble, ces protéines sont repliées de telle sorte que les hélices hydrophobes et amphipathiques soient protégées du solvant, et elles

doivent subir un changement majeur de conformation afin d'exposer les hélices hydrophobes et de pouvoir s'insérer dans la membrane (Parker et Pattus, 1993 ; Duché *et al.*, 1994 ; Zhan *et al.*, 1994 ; Lesieur *et al.*, 1997). Deux modèles décrivant l'insertion de certaines hélices du domaine I des toxines de *B. thuringiensis* ont été proposés (Figure 2) : le modèle en « parapluie » (Li *et al.*, 1991 ; Aronson et Shai, 2001) et le modèle en « canif » (Hodgman et Ellar, 1990). Dans le modèle en parapluie, ce sont les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ qui s'insèrent dans la membrane tandis que les autres hélices demeurent à la surface et forment une structure en forme de parapluie. Dans ce modèle, il semble que les domaines I et II doivent s'éloigner l'un de l'autre afin de permettre l'insertion dans la membrane. Dans le modèle en canif, ce sont les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ qui se déplient, comme la lame d'un canif, et qui s'insèrent dans la membrane. Ce modèle ne requiert pas de réarrangement du domaine I bien que l'hélice $\alpha 4$ doive probablement glisser vers le bas par rapport à $\alpha 3$ (Knowles, 1994).

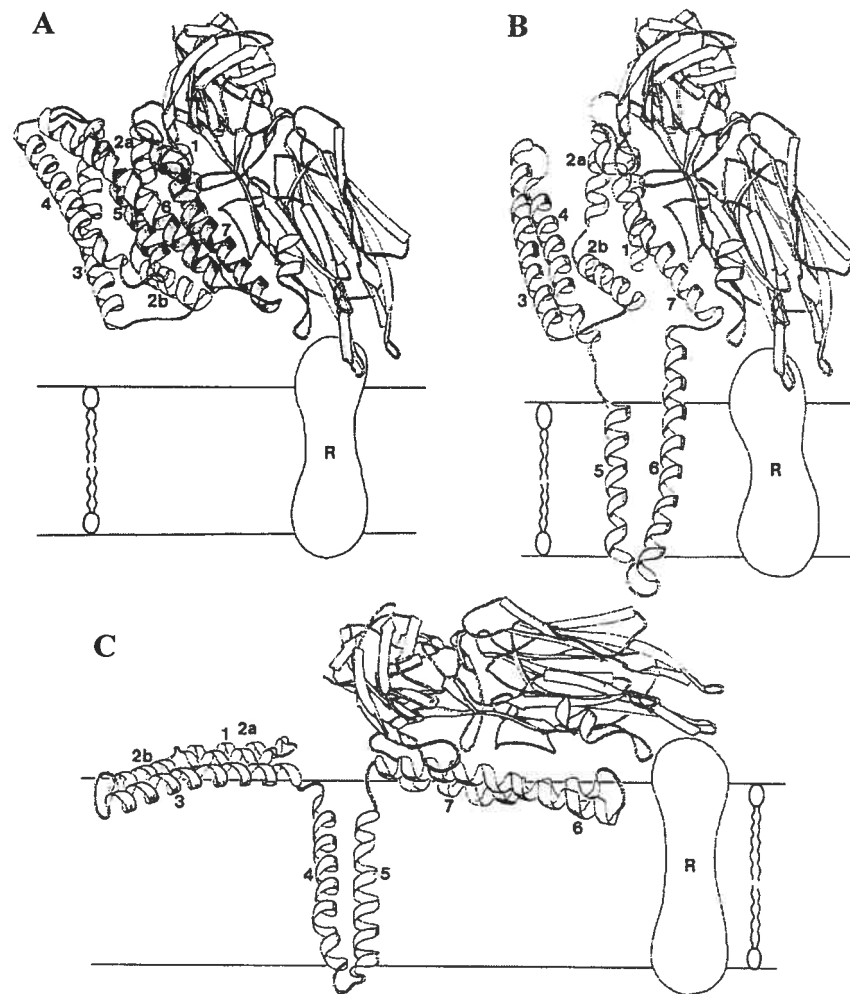


Figure 2. Modèles d'insertion des toxines de *B. thuringiensis* dans la membrane plasmique des insectes.

Les hélices α du domaine I sont numérotées à partir de l'extrémité N-terminale selon Li *et al.* (1991). Le récepteur est indiqué par la lettre R. (A) Une orientation possible de la toxine lorsqu'elle se fixe sur le récepteur. (B) Le modèle en canif modifié à partir de Hodgman et Ellar (1990) : les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ s'insèrent dans la membrane. (C) Le modèle en parapluie tel que proposé par Li *et al.* (1991) : les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ s'insèrent dans la membrane tandis que les autres hélices s'étalent à la surface de la membrane. Schéma tiré de Knowles (1994). Copyright (1994), avec la permission de Elsevier.

Afin d'étudier les changements de conformation qui doivent se produire au moment de l'insertion, Schwartz *et al.* (1997a) et Schwartz et Masson (2000) ont introduit, par mutagenèse dirigée, des cystéines dans la structure de la Cry1Aa (dont la forme activée ne contient aucune cystéine endogène) afin de créer des ponts disulfure qui réduisent la flexibilité à l'intérieur du domaine I et entre les domaines I et II (des ponts disulfure ont été formés, un à la fois, entre les boucles comprises entre les hélices $\alpha 2b$ – $\alpha 3$ et $\alpha 4$ – $\alpha 5$, entre l'hélice $\alpha 5$ et la boucle reliant $\alpha 7$ et le domaine II, entre les hélices $\alpha 2b$ et $\alpha 3$, entre $\alpha 3$ et $\alpha 4$, entre $\alpha 5$ et $\alpha 6$, et entre $\alpha 7$ et le domaine II). Ils ont par la suite analysé la capacité de ces toxines à former des pores dans des bicouches lipidiques planes en conditions oxydante et réductrice. Tous les ponts formés, sauf celui entre les hélices $\alpha 2b$ et $\alpha 3$, ont aboli la capacité des mutants à former des pores en condition oxydante. Leurs résultats suggèrent que les domaines I et II doivent s'éloigner l'un de l'autre afin de permettre l'insertion de la toxine dans la membrane et que ce sont les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ qui s'y insèrent. Cette hypothèse est compatible avec la longueur (>30 Å) et la nature amphipathique de ces hélices. De plus, les segments des hélices situés près de la boucle reliant $\alpha 4$ et $\alpha 5$, qui seraient, selon cette hypothèse, les premiers à interagir avec la membrane, sont les plus hydrophobes du domaine I (Grochulski *et al.*, 1995). On ne peut cependant pas exclure que la flexibilité des autres régions du domaine I puisse être importante.

Des études utilisant des peptides synthétiques correspondant aux hélices $\alpha 5$ et $\alpha 7$ de la Cry3Aa (Gazit et Shai, 1993 ; Gazit *et al.*, 1994 ; Gazit et Shai, 1995) et à l'hélice $\alpha 5$ de la Cry1Ac (Cummings *et al.*, 1994) ont montré que l'hélice $\alpha 5$ peut adopter une configuration transmembranaire et que $\alpha 5$, mais pas $\alpha 7$, peut s'agglomérer à l'intérieur des membranes, former des pores ayant de grandes conductances dans des bicouches lipidiques planes et perméabiliser des liposomes. Des simulations de dynamique moléculaire suggèrent aussi que l'hélice $\alpha 5$, mais pas $\alpha 7$, de la Cry3Aa devrait pouvoir s'insérer dans la membrane (Biggin et Sansom, 1996).

Des peptides artificiels correspondant à chacune des sept hélices du domaine I de la Cry3Aa ont été étudiés en détail par Gazit *et al.* (1998). Toutes les hélices, à l'exception de $\alpha 1$, se fixent aux membranes. À partir de mesures de spectroscopie infrarouge et de transfert d'énergie par résonance (*resonance energy transfert* (RET)) et

de simulations de type Monte Carlo, Gazit *et al.* (1998) ont établi que les hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 6$ adoptent probablement une orientation parallèle à la surface de la membrane tandis que les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ s'y insèrent. Pour pénétrer dans la membrane, ces hélices doivent probablement s'associer entre elles (soit entre hélices identiques ou entre $\alpha 4$ et $\alpha 5$) afin de masquer leur face hydrophile. Selon les simulations, $\alpha 7$ serait orientée à un angle de 35° par rapport à la normale de la membrane ; l'hélice adopterait donc une conformation « semi-insérée ». En accord avec les hypothèses formulées par Knowles (1994) et par Gazit et Shai (1995), ces résultats suggèrent que $\alpha 7$ pourrait jouer un rôle de senseur lors de la fixation au récepteur et initier le réarrangement structural du domaine I qui mènera finalement à la formation du pore.

Gerber et Shai (2000) ont montré qu'un peptide synthétique correspondant à l'hélice $\alpha 5$ de la Cry1Ac induit la libération de la calcéine préalablement concentrée à l'intérieur de liposomes unilamellaires. Par contre, le peptide correspondant à $\alpha 4$ ne perméabilise pas la membrane bien qu'il puisse s'y fixer. Lorsque les liposomes sont mis en présence des peptides correspondant aux hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$, la fuite de calcéine est comparable à celle qui est observée avec $\alpha 5$ seule. Par contre, un peptide correspondant aux hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ et à la boucle qui les relie est beaucoup plus actif. Il semble donc que les hélices doivent être liées l'une à l'autre pour qu'il y ait activité maximale. L'hélice $\alpha 5$ forme des oligomères en solution aqueuse tandis qu'aucune oligomérisation n'a été détectée pour $\alpha 4$ (Gerber et Shai, 2000). La capacité des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ à s'oligomériser lorsqu'elles sont fixées à la membrane a été démontrée par des mesures de transfert d'énergie par résonance entre fluorophores (*fluorescence resonance energy transfer* (FRET)) (Gerber et Shai, 2000). Ces hélices peuvent donc s'associer pour former des homooligomères ou des hétérooligomères.

En accord avec l'hypothèse selon laquelle les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ s'insèrent dans la membrane afin de former un pore fonctionnel, des mutations ponctuelles à l'intérieur des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ modifient la toxicité tandis que les mutations à la fin de l'hélice $\alpha 2b$, dans la boucle entre $\alpha 2b$ et $\alpha 3$ et dans $\alpha 6$ ont peu ou pas d'effet (Wu et Aronson, 1992 ; Aronson *et al.*, 1995 ; Masson *et al.*, 1999 ; Uawithya *et al.*, 1998 ; Vachon *et al.*, 2004a). Par contre, des mutations situées au début de l'hélice $\alpha 3$ de la Cry1Ac

abolissent ou réduisent considérablement la toxicité (Hussain *et al.*, 1996; Wu et Aronson, 1992). La plupart de ces mutations abolissent cependant un pont salin formé entre les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 2b$ (Grochulski *et al.*, 1995), ce qui pourrait perturber l'intégrité du domaine I de la toxine. Vachon *et al.* (2002, 2004a) ont récemment muté un à un tous les résidus chargés des hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ de la Cry1Aa, à l'exception de ceux qui font partie de ponts salins intramoléculaires. Les résidus ont été remplacés soit par un acide aminé neutre soit par un acide aminé de charge opposée. La majorité des modifications dans l'hélice $\alpha 3$ réduisent considérablement la toxicité envers *M. sexta* (Vachon *et al.*, 2002). Les modifications réduisent aussi la vitesse de formation des pores dans des expériences de gonflement osmotique utilisant des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées de l'intestin moyen. La modification du résidu Arg99 abolit, dans tous les cas étudiés, la formation de pores. Par contre, après une incubation de 60 min, tous les autres mutants ont une activité comparable à celle de la Cry1Aa non modifiée. Puisque la réduction de la toxicité des mutants n'est pas suivie par une diminution comparable de leur capacité à former des pores, ils pourraient être dégradés par les protéases membranaires entre l'activation et la formation des pores. L'hélice $\alpha 3$ pourrait donc jouer un rôle important dans le mécanisme de formation des pores sans toutefois être directement impliquée dans leur propriétés de conduction. La majorité des modifications dans l'hélice $\alpha 4$ réduisent aussi la toxicité (Vachon *et al.*, 2004a). Par contre, contrairement aux substitutions introduites dans $\alpha 3$, la majorité des modifications dans $\alpha 4$, à l'exception de celles portant sur le résidu Arg127, réduisent considérablement la formation de pores dans les expériences de gonflement osmotique. Il semble donc que $\alpha 4$ joue un rôle majeur dans le mécanisme de formation de pores.

La majorité des toxines Cry contiennent une proline hautement conservée qui brise l'hélice $\alpha 2$ en deux sections ($\alpha 2a$ et $\alpha 2b$). Afin d'étudier le rôle de cette brisure, Arnold *et al.* (2001) ont remplacé la proline 70 de la Cry1Ab par une glycine. Cette mutation qui augmente la flexibilité de l'hélice $\alpha 2$ diminue légèrement la stabilité de la protéine, sa toxicité et sa capacité à inhiber un courant de court-circuit au travers de l'épithélium intestinal de l'insecte. La toxine se comporte comme celle de la souche sauvage lorsque la proline et les deux résidus situés de part et d'autre de celle-ci sont enlevés par délétion. Bien qu'Arnold *et al.* (2001) concluent que le motif d'hélice brisé par la

proline 70 semble jouer un rôle dans l'organisation topologique du canal dans la membrane, leurs résultats semblent plutôt suggérer le contraire. Par ailleurs, un segment de neuf résidus de l'hélice $\alpha 7$ de la Cry1Ac peut être remplacé par un peptide hydrophobe correspondant à un segment de la toxine diphthérique. Ce remplacement augmente légèrement la toxicité et les conductances observées dans des expériences en bicouches lipidiques planes (Chandra *et al.*, 1999). Les auteurs concluent que cette augmentation de l'activité suggère une certaine importance de l'hélice $\alpha 7$ dans l'activité de la toxine. D'autre part, le fait que la toxine conserve son activité après avoir subi une modification majeure au niveau de $\alpha 7$ peut aussi suggérer que cette hélice n'est pas si importante et qu'elle ne fait probablement pas partie de la structure du pore.

Les résultats énoncés précédemment sont plutôt en accord avec le modèle en parapluie. Un autre résultat en accord avec ce modèle est la démonstration que l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Aa fait probablement face à la lumière du pore (Masson *et al.*, 1999). Le remplacement de l'acide aspartique chargé négativement en position 136 (résidu situé près du centre de l'hélice) par un résidu cystéine neutre cause une réduction importante de la conductance des pores formés dans des bicouches lipidiques planes. Une modification chimique subséquente, une fois que la toxine est insérée dans la membrane, par du (2-sulfonatoéthyl)méthanethiosulfonate de sodium (MTSES) qui réagit spécifiquement avec les cystéines et leur ajoute une charge négative, restaure partiellement la conductance des canaux. Ceci démontre non seulement que la charge négative portée par l'aspartate 136 est importante, mais aussi que ce résidu est accessible à partir de la phase aqueuse et probablement situé dans la lumière du pore. Une conclusion semblable peut être tirée du fait que le mutant Asp136Cys (comme Glu128Cys) perméabilise mieux la membrane à pH 10.5 (lorsque le groupement thiol de la cystéine est chargé négativement) qu'à pH 7.5 (Vachon *et al.*, 2004a). Il est clair qu'une charge négative sur ces deux résidus contribue à l'efficacité de la toxine. Par contre, ni l'une ni l'autre de ces études ne peut exclure la possibilité que cette charge agit surtout en favorisant la formation du pore. Il n'est pas assuré que le MTSES ait nécessairement modifié un pore déjà formé (plutôt que la toxine en solution) dans les expériences de Masson *et al.* (1999). Il faudrait faire la modification chimique dans des

conditions où la formation de nouveaux pores ne peut pas se produire, par exemple, en abaissant la température (Vachon *et al.*, 2006).

Afin de mieux comprendre le rôle de l'hélice $\alpha 4$ et de déterminer son orientation dans la membrane, la plupart des acides aminés de l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Aa ont été remplacés individuellement par une cystéine (Girard *et al.*, 2002). L'effet des mutations a été étudié dans des expériences de gonflement osmotique effectuées avec des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées de l'intestin moyen de *M. sexta*. Les mutations modifiant la plupart des résidus situés sur le côté hydrophobe de l'hélice entraînent une faible ou aucune perte d'activité tandis que celles qui portent sur les résidus situés du côté hydrophile réduisent substantiellement ou abolissent complètement l'activité de la toxine. Des expériences de toxicité montrent un patron d'activité similaire. L'effet majeur de ces mutations semble être une réduction du nombre de pores formés. Ces résultats suggèrent aussi que l'hélice $\alpha 4$ joue un rôle essentiel dans la formation des pores. L'accessibilité de chacun de ces résidus est présentement étudiée en utilisant des agents modificateurs spécifiques aux cystéines (F. Girard, V. Vachon et R. Laprade, communication personnelle).

1.6. Oligomérisation

Selon le mode d'action présentement admis, il doit y avoir oligomérisation d'un certain nombre de molécules de toxine pour qu'il y ait formation de pores. Des agrégats de toxine ont été fréquemment détectés en solution (Feng et Becktel, 1994 ; Walters *et al.*, 1994 ; Güereca et Bravo, 1999 ; Derbyshire *et al.*, 2001 ; Masson *et al.*, 2002). La taille de ceux-ci varie selon les techniques employées, les toxines étudiées et les conditions dans lesquelles elles ont été solubilisées. Contrairement à l'aérolysine (toxine produite par *Aeromonas hydrophila* et ayant un mode d'action similaire à celui des toxines de *B. thuringiensis*) qui forme des oligomères très stables ayant tous la même taille quelques minutes après son activation (Garland et Buckley, 1988 ; van der Goot *et al.*, 1992), il semble peu probable que les toxines de *B. thuringiensis* adoptent leur état final d'oligomérisation en solution. Les agrégats détectés résultent probablement de la formation d'un précipité ou d'une mauvaise solubilisation.

Les toxines Cry1Ab et Cry1Ac ont été extraites de vésicules de membrane à bordure en brosse avec un protocole déjà mis au point pour l'étude de l'oligomérisation de l'hémolysine- α de *Staphylococcus aureus* (Walker et Bayley, 1995), et leur poids moléculaire estimé par immunobuvardage. Des molécules de Cry1Ab et de Cry1Ac ayant une masse moléculaire d'environ 60, 130 et 200 kDa ont été détectées, ce qui correspondrait à des monomères, des dimères et des trimères (Aronson *et al.*, 1999 ; Manoj Kumar et Aronson, 1999 ; Aronson, 2000 ; Tigue *et al.*, 2001). Ces études montrent que les molécules de toxine se retrouvent sous forme d'oligomères à l'intérieur des membranes. Par contre, les oligomères extraits des membranes ne reflètent pas nécessairement l'état d'oligomérisation requis pour la formation du pore ; ils pourraient être des intermédiaires plus ou moins stables dans un processus de désassemblage de structures plus grosses se produisant pendant l'extraction. D'autre part, lors de l'incubation de la protoxine de la Cry1Ab avec un anticorps (scFv73) ayant des propriétés semblables à celles du récepteur Bt-R1 ressemblant à la cadhérine et en présence de suc intestinal de *M. sexta* (ou de trypsine), Gómez *et al.* (2002) ont détecté, par immunobuvardage, des dimères et des tétramères très stables qui peuvent même conserver leur état d'oligomérisation après avoir été bouillis en présence de détergent. Selon Gómez *et al.* (2002), la liaison au récepteur permettrait la formation de « pré-pores » aptes à s'insérer dans les membranes (voir section 1.9.). Il est cependant difficile d'expliquer pourquoi ces structures très stables n'ont pas été détectées dans les travaux précédents (Aronson *et al.*, 1999 ; Manoj Kumar et Aronson, 1999 ; Aronson, 2000 ; Tigue *et al.*, 2001).

1.7. Structure des pores

La structure quaternaire des pores formés par les toxines de *B. thuringiensis* à l'intérieur des membranes n'a pas encore été élucidée et, jusqu'à présent, seulement quelques auteurs ont tenté d'élaborer des modèles de pores. Notons qu'il est très difficile d'obtenir de l'information structurale sur des protéines normalement situées à l'intérieur de l'environnement membranaire par cristallographie et diffraction des rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (Lemmon et Engelman, 1994).

Hodgman et Ellar (1990) et Gill *et al.* (1992) ont proposé des modèles de pores formés de plusieurs molécules de toxine et ayant un rayon variant entre 6 et 23 Å. Le premier modèle tentant de situer précisément les hélices et les domaines fut élaboré par Schwartz *et al.* (1997a) puis raffiné par Masson *et al.* (1999) (Figure 3). Selon les résultats obtenus avec la formation des ponts disulfure (voir section 1.5.3.1.), ce sont les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ qui s'inséreraient dans la membrane. Ces auteurs ont fait l'hypothèse que l'orientation des faces hydrophobes des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ demeure inchangée par l'insertion de la toxine dans la membrane (hypothèse basée sur les travaux de Lemmon et Engelman (1994)). L'hélice $\alpha 5$ est amphipathique mais majoritairement hydrophobe. L'hélice $\alpha 4$ est aussi amphipathique et, à l'opposé de $\alpha 5$, elle est majoritairement hydrophile. Ceci suggère que la face hydrophile de $\alpha 4$ tapisse la lumière du pore tandis que $\alpha 5$ ancre le canal dans la membrane. Puisque les conductances des canaux formés par la Cry1Aa, la Cry1Ac et la Cry1Ca dans les bicouches lipidiques planes diffèrent (entre autres selon Schwartz *et al.* (1993) et Grochulski *et al.* (1995)) et puisque la région hydrophile de l'hélice $\alpha 4$ n'est pas conservée entre ces différentes toxines, les auteurs ont estimé qu'il était raisonnable de supposer que c'est $\alpha 4$ qui fait face à la lumière du pore. Selon le modèle proposé, le pore d'un diamètre d'approximativement 6 Å serait formé de quatre molécules de toxine. Les quatre hélices $\alpha 4$ s'aligneraient le long de l'axe longitudinal du pore et le résidu Asp136 ferait face à sa lumière (Figure 3). Ce modèle n'est qu'un modèle de travail et il représente le nombre minimum de molécules de toxine requis. Il ne peut donc pas être exclu que le pore soit formé de plus de quatre molécules de toxine puisque des solutés de taille supérieure à 6 Å sont capables de diffuser au travers des pores (voir section 1.8.5.2.).

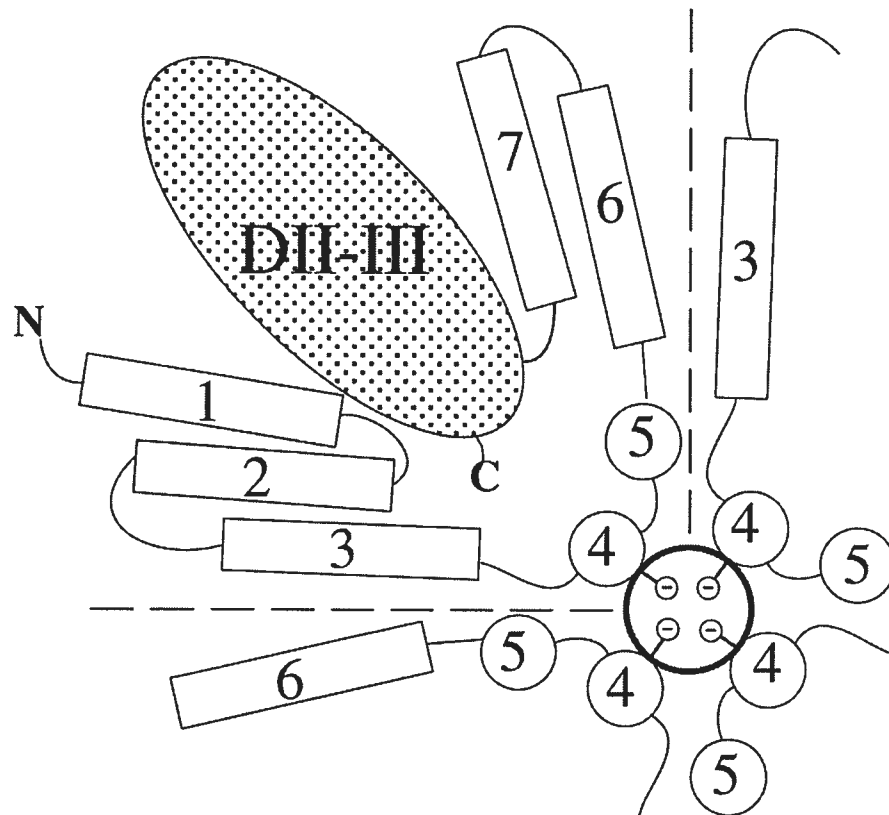


Figure 3. Modèle d'un canal formé par la Cry1Aa.

Représentation vue du haut d'un pore formé par quatre molécules de toxine insérées dans une bicouche lipidique. Les molécules de toxine sont disposées de façon à ce que la face hydrophile de l'hélice $\alpha 4$ s'aligne le long de la lumière du pore tandis que l'hélice $\alpha 5$ tapisse la surface lipidique de la membrane (cercles). La chaîne latérale de l'Asp 136 fait face à la lumière du pore pour former un anneau concentrique de charges négatives. Les rectangles représentent les cinq autres hélices. DII-III représente les domaines II et III. Schéma tiré de Masson *et al.* (1999).

Vié *et al.* (2001) ont tenté de visualiser par microscopie à force atomique la structure des pores formés par la Cry1Aa. Les images obtenues montrent une structure ayant des saillies dépassant la membrane d'environ 5–6 Å et formée de quatre sous-unités séparées par une dépression de 15 Å suggérant la présence d'un pore. La dimension des sous-unités observées correspond cependant à celle d'une hélice α . Le reste de la protéine de 65 kDa n'est pas visible. Des mesures de pression de surface et de spectroscopie infrarouge suggèrent qu'une grande partie de la toxine est insérée dans la membrane. Les images de microscopie à force atomique ne montrent cependant pas de déformation importante de la membrane en périphérie du pore. Alors que dans les expériences de bicouches lipidiques planes, sur lesquelles le modèle proposé par Schwartz *et al.* (1997b) et par Masson *et al.* (1999) se fonde et dans lesquelles la toxine s'insère une fois la bicouche formée, dans les expériences de Vié *et al.* (2001), la protéine a été insérée d'abord dans une monocouche de lipides avant que celle-ci ne soit transférée sur le support contenant une seconde monocouche, afin de former une bicouche. Cette différence dans les protocoles expérimentaux pourrait possiblement expliquer pourquoi la majeure partie de la toxine n'est pas visible à la surface de la membrane. Il serait donc très intéressant d'observer la structure des pores formés directement dans une bicouche comme il a déjà été fait, entre autres, pour l'hémolysine- α (Fang *et al.*, 1997 ; Czajkowsky *et al.*, 1998).

1.8. Propriétés biophysiques des pores

1.8.1. Pores formés dans des bicouches lipidiques planes en absence de récepteurs

Slatin *et al.* (1990) ont observé que, dans des bicouches lipidiques planes, la Cry1Ac et la Cry3Aa forment des canaux, sélectifs pour les cations, ayant un rapport de sélectivité P_K/P_{Cl} d'environ 25. Ces canaux ont seulement été observés à des pH supérieurs à 9.5. Les conductances mesurées en condition symétrique (300 mM KCl) varient entre 200 et 4 000 pS. Schwartz *et al.* (1993) ont mis en évidence que la Cry1Ca forme des canaux sélectifs pour les cations à pH 6.0 et 9.5. À pH 9.5, les canaux observés en condition symétrique (150 mM KCl) ont des conductances variant entre 12 et 200 pS. Racapé (1997) a aussi observé que la Cry1Ca forme, à pH 8.0, des canaux sélectifs pour les cations. En condition symétrique (300 mM), les conductances varient

de 16 à 295 pS en présence de KCl, entre 14 et 99 pS en présence de gluconate de potassium (KGlu), entre 10 et 96 pS en présence de gluconate de N-méthyle-D-glucamine (NMDGGlu) et entre 14 et 99 pS en présence de chlorure de N-méthyle-D-glucamine (NMDGCl). Les potentiels d'inversion mesurés en condition asymétrique de KCl (450 : 150 mM) pour la Cry1Ca à pH 9.5 et à pH 6.0 (Schwartz *et al.*, 1993), pour la Cry1Aa à pH 9.0 (Schwartz *et al.*, 1997c) et pour la Cry1Ac à pH 9.0 (Schwartz *et al.*, 1997a) sont respectivement de -23 mV, -12 mV, -25 mV et -22 mV. Les rapports de perméabilité P_K/P_{Cl} calculés à partir de ces potentiels d'inversion en utilisant l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (Hille, 1992a) sont d'approximativement 11 et 3 pour la Cry1Ca à pH 9.5 et à pH 6.0, 20 pour la Cry1Aa et 9 pour la Cry1Ac. Par ailleurs, pour la Cry1Ca, à pH 6.0 et en présence de chlorure de choline, des canaux sélectifs pour les anions ont aussi été observés (Schwartz *et al.*, 1993). En condition symétrique (150 mM), ces canaux ont des conductances variant entre 8 et 120 pS. Le potentiel d'inversion mesuré en condition asymétrique (300 : 150 mM) est de 16 mV, ce qui donne un rapport $P_{Cl}/P_{choline}$ d'environ 20. Selon toutes ces études, la conductance des pores obéit à la loi d'Ohm.

1.8.2. Pores formés dans des bicouches lipidiques planes en présence de récepteurs

Afin d'étudier l'effet du récepteur sur la formation des pores et sur leurs propriétés électriques, une préparation enrichie de l'aminopeptidase N de 120 kDa provenant de vésicules de membrane à bordure en brosse intestinale de *M. sexta* a été reconstituée dans des bicouches lipidiques planes (Schwartz *et al.*, 1997b). Dans ces conditions, les toxines Cry1Aa, Cry1Ac et Cry1Ca forment des canaux à des concentrations beaucoup plus faibles (0.33–1.7 nM) que celles qui doivent généralement être utilisées en absence de récepteurs (plus de 80 nM). Par contre, la Cry1B forme des canaux seulement à des concentrations élevées même en présence de l'extrait d'aminopeptidase. La présence de récepteurs semble donc catalyser la formation des canaux par les toxines Cry1Aa, Cry1Ac et Cry1Ca qui sont toutes actives envers *M. sexta* et ne semble pas favoriser l'incorporation de la Cry1B qui n'est pas toxique pour cette espèce (Höfte *et al.*, 1988 ; Van Rie *et al.*, 1989, 1990). En présence de récepteurs, les canaux formés par la Cry1Ac rectifient le passage des cations, ce qui n'est pas observé pour la Cry1Aa ou la Cry1Ca

pour lesquelles les courbes du courant en fonction du voltage sont linéaires (Schwartz *et al.*, 1997b).

Les toxines Cry1Ca (Lorence *et al.*, 1995), Cry1Ac (Martin et Wolfersberger, 1995; Wolfersberger, 1995) et Cry1Aa (Peyronnet *et al.*, 2001) forment des pores beaucoup plus efficacement dans des bicouches lipidiques planes dans lesquelles des vésicules de la membrane à bordure en brosse purifiées, respectivement, à partir de *S. frugiperda*, *M. sexta* ou *L. dispar*, ont été fusionnées. Notons que ces insectes sont très sensibles aux toxines étudiées. Les conductances mesurées en condition symétrique de KCl à pH 9.6 (300 mM) par Martin et Wolfersberger (1995) varient entre 13 et 56 nS ; ils notent aussi avoir mesuré une conductance de plus de 260 nS. Par contre, les conductances observées à pH 8.8 ne dépassent jamais 25% de la plus petite conductance observée à pH 9.6 (Wolfersberger, 1995). Lorence *et al.* (1995) ont mesuré, en condition asymétrique de KCl (550 : 150 mM, pH 9.0), des conductances variant entre 50 et 752 pS. Les bicouches fusionnées avec les vésicules contiennent un grand nombre de canaux endogènes qui ont, pour la plupart, une légère sélectivité pour les cations (Lorence *et al.*, 1995; Peyronnet *et al.*, 2000). L'activité de ces canaux peut être considérablement réduite lorsque les expériences sont effectuées en présence de NMDGCl (Peyronnet *et al.*, 2000). Peyronnet *et al.* (2001) ont donc tiré profit de cette condition et étudié l'activité de la Cry1Aa en condition asymétrique de NMDGCl (450 : 150 mM, pH 9.0). C'est la seule étude où les propriétés des pores formés dans des bicouches lipidiques planes, en présence et en absence de membrane à bordure en brosse fusionnée aux bicouches, sont analysées dans des conditions identiques. En présence de membrane à bordure en brosse, les conductances observées varient entre 85 et 420 pS, le rapport P_{CI}/P_{NMDG} varie entre 4 et 8, et aucune rectification n'a été observée. En comparaison, en absence de membrane à bordure en brosse, donc dans des membranes dépourvues de récepteurs, les conductances observées sont beaucoup plus petites (approximativement 8 fois) et le rapport P_{CI}/P_{NMDG} est aussi réduit (de 2 à 4 fois) ; la fonction du récepteur ne semble donc pas être limitée à la fixation de la toxine et à l'augmentation de sa concentration au voisinage de la membrane. De plus, les potentiels d'inversion mesurés pour les canaux endogènes (Lorence *et al.*, 1995; Peyronnet *et al.*, 2000) sont similaires à ceux mesurés pour les canaux formés par les toxines (Lorence *et al.*, 1995), ce qui

indique que les pores formés par la toxine ont une sélectivité ionique similaire à celle de la membrane intacte. Notons que les conductances de l'ordre de plusieurs nS mesurées par Martin et Wolfersberger (1995) sont incompatibles avec les résultats des autres expériences similaires, ce qui suggère que ces conductances ne sont pas dues à l'ouverture de canaux individuels.

1.8.3. Pores formés dans des cellules en culture

Certaines toxines Cry perméabilisent aussi la membrane plasmique de cellules d'insectes en culture, bien que celles-ci ne proviennent généralement pas de l'épithélium intestinal. Entre autres, la Cry1Ca perméabilise la membrane plasmique des cellules Sf9 (Schwartz *et al.*, 1991 ; Vachon *et al.*, 1995b ; Villalon *et al.*, 1998 ; Guihard *et al.*, 2000). Une technique d'imagerie vidéo détectant le gonflement osmotique des cellules Sf9 a montré que cette toxine forme des pores laissant passer plusieurs sels constitués d'ions monovalents (KCl, NMDGCl, KGlu, NMDGGlu), le glucose et le sucrose (Villalon *et al.*, 1998). La diffusion du raffinose n'a cependant pas pu être détectée. Le NMDGCl et le KGlu ont des vitesses de diffusion similaires. Puisque la vitesse du gonflement osmotique est limitée par la diffusion de l'espèce ionique la plus lente et que le cation NMDG^+ et l'anion Glu^- (deux dérivés du glucose) ont une taille similaire, ce résultat suggère que les pores formés par la Cry1Ca n'ont pas une très grande sélectivité ionique.

L'utilité des lignées cellulaires d'insectes pour l'étude des propriétés des toxines Cry a été remise en question notamment parce qu'elles ne correspondent pas à la cible naturelle des toxines (Wolfersberger, 1995 ; Rajamohan *et al.*, 1998 ; Schnepf *et al.*, 1998). Cependant, tout comme pour les cellules de l'intestin moyen, chez les cellules Sf9, la concentration intracellulaire de K^+ est contrôlée par un échangeur K^+/H^+ (Vachon *et al.*, 1995a) et une toxine active dépolarise la membrane plasmique (Guihard *et al.*, 2000). De plus, l'activité de la toxine Cry1Ca et l'inactivité des toxines Cry1A corrélaient bien avec les expériences de fixation (Kwa *et al.*, 1998). Les premiers événements induits par la toxine dans les cellules Sf9 ressemblent donc à ceux qui se produisent dans les cellules de l'intestin moyen des insectes (Guihard *et al.*, 2000). Il ne semble donc pas justifié de négliger les conclusions des études employant des lignées cellulaires

simplement parce qu'elles ne proviennent pas de l'intestin. Les cellules en culture ne sont cependant pas idéales pour étudier l'activité des toxines à des valeurs de pH se rapprochant de celles qui sont retrouvées dans l'intestin moyen des lépidoptères puisqu'elles peuvent être endommagées lorsqu'elles sont exposées à des pH élevés (Gringorten *et al.*, 1992 ; Guihard *et al.*, 2000 ; Tran *et al.*, 2001).

1.8.4. Pores formés dans des vésicules de la membrane à bordure en brosse

La perméabilité des pores formés par les toxines Cry dans des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées à partir de l'intestin moyen de *M. sexta* a beaucoup été étudiée avec une technique de gonflement osmotique estimant le changement de volume des vésicules à partir de l'intensité de la lumière diffusée à 90° du faisceau incident (Carroll et Ellar, 1993 ; Manoj Kumar et Aronson, 1999 ; Aronson, 2000 ; Schwartz et Laprade, 2000 ; Coux *et al.*, 2001 ; Tran *et al.*, 2001 ; Tigue *et al.*, 2001 ; Kirouac *et al.*, 2002 ; Vachon *et al.*, 2002, 2004a ; Fortier *et al.*, 2005 ; Kirouac *et al.*, 2006a,b). Le gonflement osmotique des vésicules a aussi été mesuré avec une sonde fluorescente (Carroll et Ellar, 1997). On reconnaît généralement que dans les vésicules de membrane à bordure en brosse la face luminale de la membrane est exposée vers l'extérieur (Haase *et al.*, 1978). Leur utilisation permet donc d'étudier la formation des pores sur la cible naturelle des toxines et, contrairement aux cellules en culture, sur une large gamme de pH (Tran *et al.*, 2001). En absence de toxine, le glucose, l'urée et les petits polyéthylènes glycols (PEG) diffusent facilement au travers de la membrane des vésicules (Carroll et Ellar, 1993, 1997). Les pores formés par les toxines permettent le passage de cations et d'anions monovalents et divalents et de relativement gros solutés comme le sucrose, le raffinose et des relativement gros polyéthylènes glycols (PEG 1 000 et 1 500) (Carroll et Ellar, 1993, 1997 ; Coux *et al.*, 2001 ; Tran *et al.*, 2001 ; Kirouac *et al.*, 2002 ; Vachon *et al.*, 2002, 2004a).

1.8.5. Taille des pores

1.8.5.1. Détermination de la taille des pores à partir de leur conductance

Si on fait l'approximation que le pore est un cylindre parfait, que l'interaction entre les ions traversant le pore et les parois est négligeable, et qu'il contient exactement la même solution que la phase aqueuse externe, on peut estimer les dimensions du pore à partir de sa conductance (Λ) avec l'équation suivante (Hille, 1992b) :

$$\Lambda = \frac{\sigma \pi r^2}{\ell} \quad (1)$$

où σ est la conductance spécifique de la solution, r , le rayon du pore et ℓ , sa longueur. Cette équation ne tient cependant pas compte des résistances d'accès (Hille, 1992b). À partir de la conductance mesurée dans des bicouches lipidiques planes, il est donc possible d'estimer le diamètre du pore. Les conductances observées par Racapé (1997) pour la Cry1Ca en condition symétrique de KCl varient entre 16 et 295 pS. La solution standard utilisée par Racapé (1997) a une conductance spécifique de 42.8 mS/cm (Peyronnet *et al.*, 2002). En faisant l'hypothèse que la longueur du pore est égale à l'épaisseur d'une membrane composée de lipides de type palmitoyl-oleoyl-phosphatidylethanolamine, $\ell \approx 42$ Å (Rand et Parsegian, 1989), on trouve, à partir de l'équation (1), que les pores auraient un diamètre variant entre 1.4 et 6 Å.

1.8.5.2. Détermination de la taille des pores à partir de celle des solutés perméants

Les résultats obtenus par Villalon *et al.* (1998) montrent que les pores formés par la Cry1Ca dans les cellules Sf9, à pH 6.5, permettent la diffusion du glucose et du sucrose. Le diamètre des pores formés dans ces cellules, estimée à partir du rayon hydrodynamique du sucrose (Krasilnikov *et al.*, 1992), est donc d'au moins 9.3 Å. Par ailleurs, Tran *et al.* (2001) ont montré que les pores formés dans des vésicules de membrane à bordure en brosse par la Cry1Ca, à des pH variant entre 6.5 et 8.5, et par la Cry1Ac, à des pH variant entre 7.5 et 10.5, permettent la diffusion du raffinose. Les pores formés dans ces membranes ont donc, en se basant sur le rayon hydrodynamique du raffinose (Schultz et Solomon, 1961), un diamètre supérieur à 12 Å. Carroll et Ellar (1997) ont estimé la taille des pores formés par la Cry1Ac dans des vésicules de la

membrane à bordure en brosse de *M. sexta* à partir d'expériences de gonflement osmotique utilisant une sonde fluorescente. Selon la perméabilité des pores à divers sucres et polyéthylènes glycols, le diamètre des pores a été évalué à 24 Å à pH 8.7 et à 26 Å à pH 9.8. Dans cette étude, il n'a cependant pas été clairement démontré que la sonde ne fuit pas des vésicules en présence de toxine. De plus, la perméabilité endogène de la membrane pour les petits polyéthylènes glycols a forcé les auteurs à remplacer ces derniers par des sucres. La courbe du recouvrement de volume en fonction du rayon hydraté des molécules a donc été effectuée avec deux types de molécules. Il serait cependant très coûteux de se procurer commercialement des sucres plus gros que le raffinose en quantité suffisante pour effectuer des expériences de gonflement osmotique en utilisant un protocole similaire à celui utilisé par Carroll et Ellar (1993) et par notre équipe.

Les diamètres calculés à partir des conductances mesurées en bicouche lipidiques planes (section 1.8.5.1.) ne concordent pas avec les tailles estimées à partir de la diffusion de solutés non chargés. Les premiers sont généralement inférieurs aux seconds. Le manque de corrélation entre les résultats obtenus avec ces deux techniques a déjà été discuté, entre autres, pour la porine de *Haemophilus influenzae* type b (Vachon *et al.*, 1986) et pour la latrotoxine- α d'araignée (Krasilnikov et Sabirov, 1992). Ceci s'explique probablement par le grand nombre d'hypothèses qui ont été faites afin de calculer le diamètre à partir des conductances. De plus, les conductances des canaux, principalement ceux formés par la Cry1Aa, ne semblent pas proportionnelles aux conductances spécifiques des électrolytes dans lesquels baigne la membrane, ce qui indique probablement que ces canaux ne se comportent pas comme des pores aqueux idéaux (Peyronnet *et al.*, 2001).

1.8.5.3. Détermination de la taille des pores à partir de celle des solutés non chargés imperméants dans les expériences de bicouches lipidiques planes

Dans la majorité des expériences de bicouches lipidiques planes, plusieurs niveaux de conductance sont observés et ces derniers sont habituellement des multiples de la plus petite conductance mesurée (Peyronnet *et al.*, 2001). Il semble donc possible, comme c'est le cas pour d'autres toxines (Lesieur *et al.*, 1997), que les pores formés par les

toxines de *B. thuringiensis* soient constitués d'un nombre variable de molécules de toxine (Peyronnet *et al.*, 2001). Cette hypothèse est cependant remise en doute par les travaux de Peyronnet *et al.* (2002) utilisant la technique d'exclusion de solutés non chargés, développée par Krasilnikov *et al.* (1992), afin de déterminer le rayon des pores formés par la Cry1Ca dans les bicouches lipidiques planes. Cette technique utilise une variété de polyéthylènes glycols de différentes tailles. Les conductances de canaux unitaires sont considérablement réduites en présence de polyéthylènes glycols ayant des rayons hydratés jusqu'à 10.5 Å, ce qui indique que ces solutés peuvent pénétrer à l'intérieur des pores. Par contre, les plus gros polyéthylènes glycols ont peu d'effet sur les conductances, ce qui indique qu'ils sont exclus des pores. Cette étude suggère que la Cry1Ca forme des groupes de canaux similaires (*clusters*) ayant un rayon variant entre 10 et 13 Å (Peyronnet *et al.*, 2002). Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle qu'ont estimé Carroll et Ellar (1997) pour les pores formés par la Cry1Ac et elle est en accord avec la diffusion du raffinose.

1.9. Facteurs physico-chimiques influençant l'activité des toxines

Il est bien connu que les protoxines sont transformées en toxines actives par les protéases intestinales. Les facteurs physico-chimiques présents dans l'intestin des insectes ont très probablement une influence sur les étapes du mode d'action subséquentes à l'activation. Malgré le fait que l'intestin moyen des lépidoptères est très basique et qu'il ait été suggéré que le pH puisse jouer un rôle important dans l'activité des toxines (Wolfersberger, 1995 ; Rajamohan *et al.*, 1998 ; Schnepf *et al.*, 1998), avant les travaux de Tran *et al.*, (2001), la majorité des études portant sur le mode d'action des toxines avaient été réalisées à des pH près de la neutralité. Tran *et al.* (2001) ont étudié, avec une technique de gonflement osmotique, la capacité de la Cry1Ac et de la Cry1Ca à former des pores dans des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées de *M. sexta* à des valeurs de pH variant entre 6.5 et 10.5. De grandes différences ont été observées entre les deux toxines. La perméabilité induite par la Cry1Ac pour le KCl et le chlorure de tétraméthylammonium demeure élevée pour toute la gamme de pH. Par contre, à pH 6.5, la perméabilité pour le gluconate de potassium, le sucrose et le raffinose est considérablement réduite comparativement à celle mesurée aux pH plus

élevés. Ces résultats suggèrent que le nombre et la taille des pores formés par la Cry1Ac est réduit à pH 6.5. Par contre, la perméabilité induite par la Cry1Ca est plus grande à pH 6.5, 7.5 et 8.5 qu'à pH 9.5 et 10.5. Cette diminution d'activité à pH élevé ne peut pas être expliquée par un changement, induit par le pH, de la sélectivité ionique des pores ; elle pourrait s'expliquer par une diminution du nombre de pores formés. L'activité réduite de la Cry1Ca à pH 10.5 corrèle bien avec sa faible toxicité envers *M. sexta*. Par contre, à pH élevé, la Cry1Ea qui a une toxicité comparable à celle de la Cry1Ca, forme des pores aussi efficacement que les toxines Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac. Bien que ces résultats montrent que le pH peut influencer l'activité des toxines, ils suggèrent aussi que d'autres facteurs peuvent aussi modifier l'activité des toxines *in vivo*. Ainsi, aucun effet du pH sur l'activité de la Cry1Ca n'a été observé dans des expériences utilisant les mêmes vésicules et une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire (Chapitre 4) (Kirouac *et al.*, 2003). La principale différence entre les techniques de gonflement osmotique et de fluorescence est la force ionique lors de l'incubation de la toxine avec les vésicules.

L'effet de la force ionique et du pH sur l'activité des toxines Cry1Ac et Cry1Ca a donc été étudié (Fortier *et al.*, 2005). Les résultats obtenus avec des expériences de gonflement osmotique et d'électrophysiologie en intestins isolés montrent un effet différentiel de ces facteurs sur l'activité de ces deux toxines. L'influence de la force ionique et des cations divalents est plus importante à pH 10.5 qu'à pH 7.5. Dans les expériences en intestins isolés, à pH 10.5, une diminution de la force ionique augmente l'activité de la Cry1Ac mais diminue celle de la Cry1Ca. De façon similaire, dans les vésicules, la Cry1Ac forme des pores plus efficacement que la Cry1Ca à faible force ionique. L'augmentation de la force ionique diminue la vitesse de formation des pores par la Cry1Ac par rapport à celle de la Cry1Ca. L'activité de la Cry1Ca, qui est très faible à pH élevé, peut être augmentée par l'ajout de calcium ou par une augmentation de la force ionique. De plus, l'éthylènediaminetétraacétate (EDTA) inhibe l'activité de la Cry1Ac à pH 10.5, mais pas à pH 7.5, ce qui suggère que la présence de traces d'ions divalents est importante pour la formation de pores à pH élevé. Ces effets soulignent l'importance des interactions électrostatiques dans le mécanisme de formation des pores

et permettent d'expliquer la différence entre les résultats obtenus dans les expériences de gonflement osmotique (Tran *et al.*, 2001) et de fluorescence (Kirouac *et al.*, 2003).

La possibilité que des toxines activées puissent subir une protéolyse supplémentaire dans l'intestin de l'insecte pourrait expliquer la divergence occasionnellement observée entre leur activité *in vitro* et *in vivo* (Masson *et al.*, 1994 ; Peyronnet *et al.*, 1997 ; Coux *et al.*, 2001 ; Vachon *et al.*, 2002). Plusieurs sites de protéolyse à l'intérieur des toxines activées ont été identifiés *in vitro* (pour un résumé voir Kirouac *et al.*, 2006b). Lightwood *et al.* (2000) ont suggéré qu'un clivage à l'intérieur du domaine I de la Cry1Ac pourrait faciliter son insertion dans la membrane. Selon Gómez *et al.* (2002), la fixation de la Cry1Ab au récepteur BT-R₁ induit un changement de conformation qui permet la coupure de l'hélice $\alpha 1$; ils suggèrent que cette coupure pourrait être essentielle pour la formation des pores. Elle constitue donc la première étape du mode d'action récemment suggéré par Bravo *et al.* (2004). Selon ce modèle, la coupure de $\alpha 1$ favoriserait l'oligomérisation des molécules de toxine sous forme de tétramères appelés « pré-pores ». Les pré-pores se fixeraient ensuite à l'amonipeptidase N, située dans les radeaux lipidiques (domaines membranaires résistants, à basse température, au Triton X-100) (Zhuang *et al.*, 2002), ce qui entraînerait l'insertion des pré-pores dans la membrane.

Kirouac *et al.* (2006b) (Chapitre 5) ont montré que l'activité protéolytique des protéases membranaires ne semble pas être nécessaire pour la formation des pores par la Cry1Aa dans des expériences de gonflement osmotique utilisant des vésicules de membrane à bordure en brosse. La Cry1Aa activée est complètement fonctionnelle et ne requiert pas la coupure de l'hélice $\alpha 1$, ce qui remet en question les premières étapes du modèle de Bravo *et al.* (2004). Cependant, l'effet des protéases solubles présentes dans l'intestin ne peut pas être étudié avec la technique de gonflement osmotique car le suc intestinal déstabilise les vésicules de membrane à bordure en brosse (J.-F. Brunet, V. Vachon et R. Laprade, résultats non publiés). Par contre, l'effet du suc intestinal et de ses constituants sur l'activité des toxines peut néanmoins être étudié avec la technique d'électrophysiologie en intestins isolés développée par Peyronnet *et al.* (1997) (J.-F. Brunet, M. Fortier, V. Vachon et R. Laprade, résultats non publiés) ; cette étude est présentement en cours au sein de notre laboratoire.

1.10. Conclusion

Malgré les progrès récents, le mécanisme de formation des pores, notamment le passage de la forme soluble de la toxine à une forme intégrée dans la membrane, est encore loin d'être complètement élucidé (Schwartz et Laprade, 2000 ; Mathur *et al.*, 2004). Les principales avenues de recherche et de développement des nouveaux produits insecticides à base de *B. thuringiensis* sont la construction de nouveaux gènes et la fabrication de plantes transgéniques. Ces développements nécessitent cependant une bonne connaissance du mode d'action des toxines au niveau moléculaire (Schwartz et Laprade, 2000). De plus, l'utilisation massive des toxines de *B. thuringiensis* pourrait mener au développement de populations d'insectes nuisibles résistants aux toxines (Frutos *et al.*, 1999 ; Van Rie, 2000). Une meilleure compréhension de l'interaction entre les toxines et les cellules des insectes est nécessaire afin de gérer prudemment les insectes nuisibles en s'assurant que l'utilisation des bioinsecticides se fasse de façon à promouvoir leur longévité, c'est-à-dire en retardant l'apparition de la résistance (Fortier et Kirouac, 2000 ; Vachon *et al.*, 2004b). Une meilleure compréhension du mode d'action facilitera aussi l'homologation des nouveaux produits à base de *B. thuringiensis*.

TRAVAUX DE RECHERCHE

AVANT-PROPOS

La fixation des molécules de toxine sur des récepteurs spécifiques situés à la surface de la membrane et la formation d'un pore transmembranaire sont les étapes les mieux comprises du mode d'action des toxines du bacille de Thuringe. Par contre, le rôle exact des récepteurs, les étapes subséquentes à la fixation ainsi que la structure et les propriétés biophysiques des pores formés ne sont pas encore complètement élucidés. Les pores formés par les toxines de *B. thuringiensis* dans la membrane plasmique des cellules en culture (Knowles et Ellar, 1987 ; Vachon *et al.*, 1995b ; Villalon *et al.*, 1998) et dans les vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées de l'intestin moyen de *M. sexta* (Hendrickx *et al.*, 1990 ; Carroll et Ellar, 1993, 1997 ; Coux *et al.*, 2001 ; Tran *et al.*, 2001) permettent la diffusion de plusieurs cations et anions monovalents et de relativement gros solutés neutres. Par contre, la plupart des canaux formés dans des bicouches lipidiques planes en présence (Schwartz *et al.*, 1997b ; Lorence *et al.*, 1995) et en absence de récepteurs (Slatin *et al.*, 1990 ; Schwartz *et al.*, 1993 ; Schwartz *et al.*, 1997b,c ; Peyronnet *et al.*, 2001) sont sélectifs pour les cations. Des canaux sélectifs pour les anions ont aussi été observés (Schwartz *et al.*, 1993). Pour approfondir l'étude de la sélectivité ionique des pores formés par les toxines, la perméabilité induite par les toxines Cry1Aa et Cry1Ac aux cations et anions divalents ainsi qu'à une variété d'acides aminés a été mesurée dans des vésicules de membrane à bordure en brosse, purifiées à partir de l'intestin moyen de *M. sexta*, avec une technique de gonflement osmotique fondée sur des mesures de lumière diffusée (Chapitre 3) (Kirouac *et al.*, 2002). Tel qu'énoncé dans la section 1.8.4., cette technique a beaucoup été utilisée afin d'étudier la perméabilité des pores formés par les toxines Cry et l'utilisation de ce type de vésicules permet d'étudier la formation des pores sur la cible naturelle des toxines et sur une large gamme de pH. De plus, ces vésicules ont beaucoup été utilisées pour l'étude de la fixation des molécules de toxine à la membrane. À la suite du choc osmotique, les vésicules regonflent plus ou moins rapidement en fonction de la perméabilité de leur membrane au soluté. Sachant que l'activité des deux toxines utilisées est peu influencée par le pH (Tran *et al.*, 2001), la charge nette des solutés a été variée en changeant le pH

des solutions. Nous avons démontré que les ions divalents et les acides aminés diffusent bien à travers les pores formés par les toxines et que les pores ont une légère sélectivité pour les cations par rapport aux anions.

Les effets des toxines sur la perméabilité membranaire de vésicules de *M. sexta* ont aussi été mesurés avec une molécule fluorescente sensible au potentiel membranaire, le diS-C₃(5) (Chapitre 4) (Kirouac *et al.*, 2003). Cette sonde avait déjà été utilisée afin d'étudier les pores formés par les toxines de *B. thuringiensis* (Uemura *et al.*, 1992 ; Lorence *et al.*, 1995). Les conclusions tirées de ces expériences se basaient cependant sur la supposition que les changements de fluorescence observés sont dus exclusivement à un changement de potentiel membranaire et ce, même s'il a déjà été démontré que ce type de mesures est fortement influencé par d'autres facteurs comme la force ionique et le pH des solutions (Hladky et Rink, 1976 ; Waggoner, 1979 ; Wright, 1984). Nos résultats confirment l'importance de ces facteurs et remettent en question les conclusions de nombreuses études portant sur les toxines de *B. thuringiensis* basées sur des expériences de fluorescence où la force ionique n'a pas été gardée constante au cours des expériences. Ces travaux ont permis la mise au point d'une technique efficace et fiable pour évaluer rapidement les effets des toxines. Le potentiel membranaire généré, en présence de valinomycine, par un efflux d'ions potassiques est diminué par la présence de toxines actives. De plus, nos résultats démontrent que, contrairement à une opinion répandue, les pores formés par la toxine ne modifient que très peu la sélectivité ionique endogène de la membrane. La diminution de la capacité de la toxine CryI_{Ca} à former des pores à pH élevé, mise en évidence avec la technique de gonflement osmotique (Tran *et al.* 2001), n'a cependant pas été observée dans les expériences de fluorescence. Cette différence suggère que la force ionique des solutions lors de la formation des pores, principale différence entre ces deux techniques, pourrait influencer l'activité des toxines et donc expliquer ce manque de corrélation. L'importance des effets de la force ionique sur la capacité des toxines à former des pores a été, par la suite, confirmée et étudiée de façon détaillée (Fortier *et al.*, 2005).

D'autres facteurs présents dans l'intestin de l'insecte sont aussi susceptibles d'influencer l'activité des toxines. Il a entre autres été proposé que, suite à la liaison au récepteur, l'hélice $\alpha 1$ doive être coupée par les protéases intestinales afin de permettre la

formation des pores (Gómez *et al.*, 2002). Aussi, afin de déterminer si les protéases de la membrane luminale de l'intestin jouent un rôle dans le processus de formation des pores, l'activité de la Cry1Aa a été étudiée avec la technique de gonflement osmotique en présence d'une variété d'inhibiteurs de protéases (Chapitre 5) (Kirouac *et al.*, 2006b). L'utilisation de ceux-ci est la façon la plus simple d'étudier le rôle des protéases membranaires. La plupart des inhibiteurs n'ont pas d'effet sur la vitesse de formation des pores, et aucun d'entre eux ne peut en empêcher la formation dans toutes les conditions testées. L'activité de ces protéases ne semble donc pas nécessaire à la formation de pores, et la Cry1Aa activée avec la trypsine est complètement fonctionnelle.

La technique de gonflement osmotique utilisée dans ces études est une des principales méthodes employées en biophysique pour étudier la perméabilité membranaire. Bien qu'elle soit couramment utilisée dans de nombreuses études portant sur le mode d'action des toxines, notamment au sein de notre laboratoire, la cinétique de recouvrement de volume n'est pas bien comprise. En présence de toxine et à la suite d'un choc hypertonique, les vésicules ne regonflent que rarement jusqu'à leur volume initial. Afin d'étudier la cinétique de regonflement des vésicules, les résultats obtenus expérimentalement ont été comparés avec ceux d'un modèle mathématique qui prédit la variation du volume des vésicules en fonction de leur perméabilité aux divers solutés (Chapitre 6) (Kirouac *et al.*, 2006a). Les résultats de ces travaux suggèrent fortement qu'une force mécanique contribue au regonflement des vésicules de membrane à bordure en brosse. Ces travaux mettent donc en évidence une propriété importante, et méconnue jusqu'à présent, des vésicules de membrane à bordure en brosse. Ils démontrent que cette force mécanique n'agit pas seulement dans des vésicules d'insectes mais aussi dans des vésicules de mammifères, utilisées très abondamment pour l'étude du transport membranaire. Ils établissent que cette propriété est, selon toute vraisemblance, attribuable à la présence du cytosquelette.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Préparation des vésicules membranaires

La majorité des expériences ont été effectuées avec des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées à partir de l'intestin moyen de *M. sexta*. Les oeufs fertilisés ont été achetés de la Carolina Biological Supply Company (Burlington, Caroline du Nord) ou de l'insectarium du département d'entomologie de la North Carolina State University (Raleigh, Caroline du Nord), et les larves ont été élevées sur un milieu artificiel standard fourni avec les insectes. Les intestins moyens des larves du 5^e stade ont été isolés, et les tubules de Malpighi détachés. Les intestins ont par la suite été vidés de leur contenu luminal et rincés dans une solution glacée composée de 300 mM sucrose, 17 mM tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris)-HCl, pH 7.5, et 5 mM éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétraacétate (EGTA). Les vésicules de membrane à bordure en brosse ont été préparées à partir de ces intestins avec une technique de précipitation au magnésium et de centrifugation différentielle décrite par Wolfersberger *et al.* (1987). Les préparations finales de vésicules ont été suspendues dans 10 mM N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonate) (Hepes)-KOH, pH 7.5, et entreposées à -80°C.

Dans certaines expériences, les résultats obtenus avec les vésicules de *M. sexta* ont été comparés avec ceux obtenus avec des microsomes de foie de rat et avec des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées à partir du jéjunum de lapin. Les microsomes de foie de rat ont été préparés avec la méthode de van de Werve (1989) légèrement modifiée. Les foies de rats Wistar (Charles River, Saint-Constant, Québec) ont été prélevés et perfusés avec une solution glacée de 0.9 g NaCl/100 ml puis homogénéisés sur la glace dans 4 ml/g de tissu d'une solution composée de 250 mM sucrose et de 50 mM Hepes-Tris, pH 7.3, à l'aide d'un malaxeur Waring pendant 30 s à vitesse maximale. L'homogénat a été passé 10 fois dans un homogénéisateur Potter et centrifugé pendant 10 min à 1 000 × g. Le surnageant a ensuite été centrifugé à 12 000 × g pendant 20 min, et le second surnageant centrifugé à 100 000 × g pendant 60 min. Le

culot a ensuite été suspendu dans 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3, centrifugé à $100\,000 \times g$ pendant 60 min, suspendu dans la même solution et entreposé dans l'azote liquide.

La partie proximale du petit intestin de lapins blancs mâles New Zealand (Charles River) ont été prélevés et rincés dans une solution glacée de 0.9 g NaCl/100 ml. Les vésicules de membrane à bordure en brosse ont par la suite été préparées avec une technique de précipitation au magnésium et de centrifugation différentielle décrite par Maenz *et al.* (1991, 1992). La préparation finale a été suspendue dans 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3, et entreposée dans l'azote liquide.

2.2. Préparation des toxines

Les souches HD73Cry⁻ et HD1Cry⁻B de *B. thuringiensis* et HB101 et DH5 α de *Escherichia coli* ont été transformées, respectivement, avec les plasmides pBA1 (Bah *et al.*, 2004), p60.5G31 (Visser *et al.*, 1988), pMP30 (Masson *et al.*, 1989) et pEM14 (Visser *et al.*, 1990) afin de produire les protoxines Cry1Aa, Cry1Ca, Cry1Ab et Cry1Ea. La protoxine Cry1Ba, provenant de la souche HD-110 de *B. thuringiensis*, a été produite dans une souche recombinante du bacille de Thuringe (Rang *et al.*, 2004). La protoxine Cry1Ac a été produite directement à partir de la souche HD-73 de *B. thuringiensis*. Les protoxines ont ensuite été solubilisées, activées avec la trypsine et purifiées par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions de type Mono Q (Pharmacia Biotech, Montréal, Québec) tel que décrit par Masson *et al.* (1989, 1994).

2.3. Mesures de gonflement osmotique

La perméabilité des membranes a été analysée en utilisant une technique de gonflement osmotique fondée sur des mesures de lumière diffusée (Kasai et Nunogaki, 1988 ; Carroll et Ellar, 1993). En préparation pour les expériences, les vésicules ont été habituellement diluées à 90% du volume final désiré avec la solution tampon appropriée et incubées une nuit à 4°C afin de permettre aux solutés de s'équilibrer de part et d'autre de la membrane. Avant le début de l'expérience, elle ont été diluées à 0.4 mg de protéine membranaire/ml dans le même tampon et avec assez d'albumine sérique bovine pour obtenir une concentration finale de 1 mg/ml. L'albumine sérique bovine fait compétition

à la toxine pour la fixation sur la paroi de la tubulure du montage expérimental. La plupart des solutions utilisées dans les expériences de gonflement osmotique contiennent 1 mg/ml d'albumine sérique bovine.

Les vésicules ont d'abord été réchauffées à 23°C puis mélangées rapidement, à l'intérieur d'une cuvette, avec un volume égal d'une solution hypertonique en utilisant un appareil de type *stopped-flow* (Hi-Tech Scientific Co., Salisbury, Royaume-Uni). L'intensité de la lumière diffusée par la suspension de vésicules a été mesurée dans un spectrofluorimètre de marque PTI (Photon Technology International, South Brunswick, New Jersey) ou Spex (Jobin Yvon Horiba, Edison, New Jersey) équipé d'un tube photomultiplicateur situé à 90° du faisceau incident, à une longueur d'onde de 450 nm et, sauf exception, à une fréquence de 10 Hz. À la suite du choc osmotique, l'eau sort et les vésicules rétrécissent rapidement, ce qui se traduit par une augmentation de l'intensité de la lumière diffusée. Puis, selon la perméabilité de la membrane pour le soluté externe, celui-ci diffuse vers l'intérieur et est accompagné d'un mouvement d'eau, ce qui fait regonfler les vésicules et se traduit par une diminution de l'intensité de la lumière diffusée. Dans ces expériences, les vésicules ont été soit incubées pendant 60 min avec la toxine, avant de subir le choc osmotique, soit mises en contact avec la toxine au moment du choc osmotique. Suite au choc osmotique, le gonflement des vésicules a été enregistré pendant 60 s lorsque les vésicules ont été préalablement incubées avec la toxine ou pendant 6 min lorsque les vésicules ont été mélangées avec la toxine au moment du choc osmotique.

L'intensité de la lumière diffusée a d'abord été convertie en intensité relative : la valeur 1 a été attribuée à la plus haute intensité mesurée en absence de toxine et la valeur 0 à l'intensité minimale observée (Tran *et al.*, 2001). Afin de résumer les résultats d'un grand nombre d'expériences similaires et de faciliter leur comparaison, les données ont été souvent présentées en pourcentage de recouvrement de volume défini comme $100(1-I_t)$, où I_t est l'intensité relative mesurée au temps t . Pour les expériences dans lesquelles la cinétique de formation de pores a été étudiée, c'est-à-dire lorsque les vésicules et la toxine ont été mises en contact lors du choc osmotique, les valeurs mesurées en condition contrôle, en absence de toxine, ont été soustraites des valeurs mesurées avec toxine. Les courbes ont ensuite été lissées avec une sigmoïde de

Boltzmann, et la vitesse de gonflement osmotique maximale a été définie comme étant la pente maximale de ces courbes.

Les données présentées sont habituellement des moyennes \pm erreur type sur la moyenne d'au moins trois expériences utilisant des préparations de vésicules différentes. Les valeurs expérimentales de chaque expérience sont la moyenne de cinq mesures obtenues avec la même préparation de vésicules. Les tests statistiques ont été effectués avec le test de Student bilatéral.

2.4. Mesures utilisant une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire

La variation du potentiel membranaire généré au travers de la membrane des vésicules de *M. sexta* a été mesurée avec une sonde fluorescente, l'iodure de 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine (diS-C₃(5)). En préparation pour l'expérience, les vésicules ont été centrifugées à $12\,200 \times g$ pendant 20 min et le culot suspendu à 2 mg protéine/ml dans la solution avec laquelle les vésicules devaient être chargées. Les vésicules ont été incubées une nuit à 4°C afin de permettre aux solutés de s'équilibrer de part et d'autre de la membrane. Les vésicules ont été conservées à 4°C jusqu'à ce qu'elles soient injectées dans la cuvette, sauf dans les cas où une incubation de 60 min avec la toxine a été effectuée à 23°C avant leur injection.

Les mesures de fluorescence ont été effectuées à 23°C dans un spectrofluorimètre de marque Spex à une fréquence de 10 Hz, une longueur d'onde d'excitation de 620 nm et une longueur d'onde d'émission de 670 nm. La solution tampon appropriée a été agitée à la noirceur pendant 10 min dans une cuvette de polystyrène contenant 1.5 μ M de diS-C₃(5) (Molecular Probes, Eugene, Oregon), provenant d'une solution mère de 1 mM dans le sulfoxyde diméthylque, avant le début de chaque expérience afin de permettre au niveau de fluorescence de se stabiliser (Hoffman et Laris, 1974 ; Sims *et al.*, 1974). Quelques secondes après le début de l'enregistrement, les vésicules ont été injectées dans la cuvette à une concentration finale de 10 μ g de protéine membranaire/ml. Dans certains cas, 7.5 μ M de valinomycine (Sigma, St. Louis, Missouri) ont été ajoutés dans la cuvette à partir d'une solution mère de 5 mM dans l'éthanol. Lorsqu'un potentiel membranaire négatif est généré à l'intérieur des vésicules,

par exemple suite à l'ajout de valinomycine, les molécules de sonde chargées positivement s'associent à la membrane et se concentrent à l'intérieur des vésicules. La concentration de la sonde résulte en une diminution de l'intensité de la lumière diffusée due à l'agrégation des molécules de sonde (Sims *et al.*, 1974 ; Waggoner, 1979 ; Plášek et Sigler, 1996).

Les mesures de fluorescence ont été normalisées par rapport au niveau mesuré avant l'ajout des vésicules. Pour chaque condition expérimentale testée, les niveaux de fluorescence atteints en absence de potentiel membranaire ont été mesurés en injectant les vésicules dans une cuvette contenant la solution avec laquelle les vésicules ont été chargées. Les données présentées sont habituellement des moyennes \pm erreur type sur la moyenne d'au moins trois expériences utilisant des préparations de vésicules différentes. Les valeurs expérimentales de chaque expérience sont la moyenne de quatre mesures obtenues avec la même préparation de vésicules. Les tests statistiques ont été effectués avec le test de Student bilatéral.

2.5. Simulation des expériences de gonflement osmotique

Un modèle dérivé de la loi de diffusion de Fick et semblable à celui proposé par Jacobs (1952) a été élaboré afin de simuler la variation du volume des vésicules dans les expériences de gonflement osmotique. Les vésicules théoriques contiennent X_A moles du soluté A, X_B moles du soluté B et X_W moles d'eau. Leur membrane a les perméabilités (en cm^3/s) P_A , P_B et P_W pour les solutés A et B et pour l'eau, respectivement. Au temps 0, les vésicules sont mélangées avec A et B aux osmolarités C_A et C_B , et on suppose que ces osmolarités ne changent pas dans le temps. Les équations suivantes décrivent la variation du nombre de moles de A, de B et d'eau à l'intérieur des vésicules en fonction du temps t :

$$\frac{dX_A}{dt} = P_A \left(C_A - \frac{X_A}{V} \right) \quad (2)$$

$$\frac{dX_B}{dt} = P_B \left(C_B - \frac{X_B}{V} \right) \quad (3)$$

$$\frac{dX_W}{dt} = P_W \left[\frac{X_A + X_B}{V} - (C_A + C_B) \right] \quad (4)$$

Le volume V des vésicules peut être calculé pour chaque valeur de t avec l'équation suivante:

$$V(t) = v_A X_A(t) + v_B X_B(t) + v_W X_W(t) \quad (5)$$

où v_A , v_B et v_W sont respectivement les volumes molaires de A, de B et de l'eau. Les équations différentielles ont été résolues avec l'algorithme de Runge-Kutta, programmé en Fortran 77 et compilé sur un système Unix. Pour les simulations, les vésicules sont considérées comme des sphères ayant un diamètre de 100 nm. La perméabilité à l'eau (P_W) a été fixée à $9 \times 10^{-13} \text{ cm}^3/\text{s}$, une valeur qui permet aux vésicules de rétrécir complètement en 0.2–0.3 s, ce qui correspond au temps de rétrécissement dans les expériences standard de gonflement osmotique (Tran *et al.*, 2001; Kirouac *et al.*, 2002). Afin de simplifier les calculs, on considère que le volume molaire des solutés est égal à celui de l'eau ($18 \text{ cm}^3/\text{mol}$). Dans ces simulations, le volume occupé par le soluté est négligeable comparativement à celui occupé par l'eau. Le volume des vésicules a été calculé pour chaque valeur de t et converti en volume relatif. Pour chaque série de simulations, la valeur 0 a été attribuée au volume le plus petit et la valeur 1 au volume initial des vésicules. Afin de faciliter les comparaisons avec les résultats obtenus dans les expériences de lumière diffusée, les résultats des simulations sont présentés sous la forme de 1 moins le volume relatif des vésicules.

RÉSULTATS

CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai participé activement en tant que chercheur principal à l'ensemble de ces travaux. J'ai été dirigé par le Professeur Raynald Laprade et par Vincent Vachon, attaché de recherche. Celui-ci m'a aussi aidé à élaborer les protocoles expérimentaux et à effectuer des expériences, notamment pour les articles présentés dans les Chapitres 4 (Kirouac *et al.*, 2003) et 6 (Kirouac *et al.*, 2006a). La rédaction des articles a été majoritairement faite par moi aidé de R. Laprade et de V. Vachon pour l'interprétation générale des résultats et la correction de l'anglais. Ces projets ont été financés à partir des fonds de recherche des Professeurs R. Laprade et Jean-Louis Schwartz. D'autres collaborateurs ont aussi participé à ces travaux, et leur contribution est présentée ci-après.

Chapitre 3 (Kirouac *et al.*, 2002)

Jean-François Noël et Frédéric Girard étaient alors étudiants, respectivement, au baccalauréat en biologie à l'Université de Sherbrooke et en physique à l'Université de Montréal. Ils ont effectué un stage au sein du laboratoire. Je leur ai d'abord appris les techniques utilisées dans ce projet, puis ils ont contribué à l'avancement des expériences et à la compilation des résultats.

Chapitre 4 (Kirouac *et al.*, 2003)

Sébastien Rivest, alors technicien au sein de notre laboratoire, a participé à l'élaboration initiale du projet. Il m'a aussi aidé à effectuer les expériences et à fabriquer les vésicules de membrane à bordure en brosse.

Chapitre 5 (Kirouac *et al.*, 2006b)

Delphine Quievy, alors étudiante au baccalauréat en physique à l'Université de Montréal, a effectué deux stages d'été au sein du laboratoire. Sous ma direction, elle a contribué à l'avancement des expériences et à la compilation des résultats.

Chapitre 6 (Kirouac *et al.*, 2006a)

Cette étude a eu pour point de départ des résultats d'expériences effectuées par V. Vachon, Mélanie Fortier, étudiante au doctorat en physique à l'Université de Montréal, et moi-même. Afin d'expliquer ces résultats, j'ai réalisé de nouvelles expériences et effectué des simulations numériques. M. Fortier a participé à la compilation et à l'interprétation des résultats. Marie-Claude Trudel, conseillère en technologie biomédicale, m'a aidé à effectuer les simulations numériques. J'ai discuté des hypothèses présentées avec le Professeur Alfred Berteloot qui nous a aussi fourni le support technique pour la fabrication des microsomes de rat et des vésicules d'intestin de lapin utilisés dans ces travaux.

CHAPITRE 3

AMINO ACID AND DIVALENT ION PERMEABILITY OF THE PORES FORMED BY THE *BACILLUS THURINGIENSIS* TOXINS CRY1AA AND CRY1AC IN INSECT MIDGUT BRUSH BORDER MEMBRANE VESICLES

Martin Kirouac, Vincent Vachon, Jean-François Noël, Frédéric Girard,
Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade

Biochimica et Biophysica Acta 1561 (2002) 171–179

RÉSUMÉ

Les pores formés par les toxines insecticides du bacille de Thuringe permettent la diffusion d'une variété de cations et d'anions monovalents et de molécules neutres. Afin de préciser leur sélectivité ionique, la perméabilité membranaire, induite par la Cry1Aa et la Cry1Ac, aux acides aminés (Asp, Glu, Ser, Leu, His, Lys et Arg) et aux cations (Mg^{2+} , Ca^{2+} et Ba^{2+}) et anions (SO_4^{2-} et phosphate) divalents a été analysée à pH 7.5 et 10.5 avec des vésicules de membrane à bordure en brosse isolées de *Manduca sexta* et une technique de gonflement osmotique. Le nombre de charges négatives portées par les acides aminés et les ions phosphate est plus élevé à pH 10.5 qu'à pH 7.5. Tous les acides aminés diffusent bien au travers des pores formés par les toxines et, à l'exception de l'aspartate et du glutamate, la perméabilité aux acides aminés est moins grande au pH le plus élevé. En présence des deux toxines, la perméabilité membranaire est plus grande pour les chlorures de cations divalents que pour les sels potassiques d'anions divalents. Ces résultats indiquent clairement que les pores ont une sélectivité cationique.

Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the
Bacillus thuringiensis toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush
border membrane vesicles

Martin Kirouac ^a, Vincent Vachon ^a, Jean-François Noël ^a, Frédéric Girard ^a,
Jean-Louis Schwartz ^{a,b}, Raynald Laprade ^{a,*}

^a *Groupe de Recherche en Transport Membranaire, Université de Montréal, P.O. Box
6128, Centre Ville Station, Montreal, QC, Canada H3C 3J7*

^b *Biotechnology Research Institute, National Research Council, 6100 Royalmount
Avenue, Montreal, QC, Canada H4P 2R2*

Received 6 September 2001; received in revised form 5 December 2001;
accepted 13 December 2001

Reprinted from *Biochimica et Biophysica Acta* 1561 (2002) 171–179.

Copyright (2002), with permission from Elsevier.

* Corresponding author. Fax: +1-514-343-7146.

[REDACTED]

Keywords: Insecticidal toxins; Ion selectivity; Membrane permeability; Brush border
membrane vesicles; *Bacillus thuringiensis*; *Manduca sexta*

Abstract

The pores formed by *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins have been shown to allow the diffusion of a variety of monovalent cations and anions and neutral solutes. To further characterize their ion selectivity, membrane permeability induced by Cry1Aa and Cry1Ac to amino acids (Asp, Glu, Ser, Leu, His, Lys and Arg) and to divalent cations (Mg^{2+} , Ca^{2+} and Ba^{2+}) and anions (SO_4^{2-} and phosphate) was analyzed at pH 7.5 and 10.5 with midgut brush border membrane vesicles isolated from *Manduca sexta* and an osmotic swelling assay. Shifting pH from 7.5 to 10.5 increases the proportion of the more negatively-charged species of amino acids and phosphate ions. All amino acids diffused well across the toxin-induced pores, but, except for aspartate and glutamate, amino acid permeability was lower at the higher pH. In the presence of either toxin, membrane permeability was higher for the chloride salts of divalent cations than for the potassium salts of divalent anions. These results clearly indicate that the pores are cation selective.

1. Introduction

Bacillus thuringiensis insecticidal toxins act specifically at the level of the luminal brush border membrane of midgut epithelial cells where they bind to specific receptors and form lethal transmembrane permeability channels [1,2]. Several putative toxin receptors have been identified from a variety of lepidopteran species. Among these, various toxin-binding glycosylphosphatidylinositol-anchored aminopeptidase N isoforms from *Manduca sexta* [3–8], *Heliothis virescens* [9,10], *Lymantria dispar* [11,12], *Bombyx mori* [13–15] and *Plutella xylostella* [7,16] and cadherin-like proteins from *M. sexta* [17,18] and *B. mori* [19] have been purified, cloned and sequenced. More recently, an anionic glycoconjugate that binds Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac was isolated from the brush border membrane of *L. dispar* [20]. Further evidence that some of these proteins act as toxin receptors was provided by experiments in which the 120-kDa aminopeptidase from *M. sexta* [4] and the 170-kDa aminopeptidase from *H. virescens* [10] were shown to enhance Cry1Ac-induced $^{86}\text{Rb}^+$ efflux from liposomes. The former protein was also shown to stimulate ion channel formation by this toxin when reconstituted in planar lipid bilayers [21]. In addition, Sf9 cells expressing the 175-kDa cadherin-like protein from *B. mori* acquired sensitivity to Cry1Aa [22]. Finally, detailed analyses of toxin-mediated inhibition of amino acid transport into insect midgut brush border membrane vesicles has provided evidence suggesting that certain potassium-dependent amino acid symporters could also act as *B. thuringiensis* toxin receptors [23–26].

The pores formed by *B. thuringiensis* toxins in the plasma membrane of cultured insect cells [27–29] and in brush border membrane vesicles [30–34] allow the diffusion of a variety of monovalent cations and anions and relatively large neutral solutes such as sucrose, raffinose, alanine and polyethylene glycols. On the other hand, the formation of cation-selective pores has been clearly demonstrated in planar lipid bilayer experiments, both in the presence [21,35] and absence [21,36–38] of reconstituted membrane receptors, although ion selectivity of the pores can be modified by the incorporation of brush border membranes in the lipid bilayer [39]. The fact that anion-selective pores have also been observed with Cry1C at pH 6.0 [37] has suggested that the apparent lack of selectivity in cultured cells and brush border membrane vesicles could have resulted

from the use of a near neutral pH [1,2], appropriate for the culture of insect cells, but much lower than what is normally found in the lepidopteran midgut lumen [40,41]. Nevertheless, experiments conducted at pH 7.5 with a membrane potential-sensitive fluorescent probe also suggested the formation of cation-selective pores in brush border membrane vesicles [35,42]. In addition, the pore-forming properties of Cry1Aa and Cry1Ac, in contrast with those of Cry1C, were recently found to be remarkably similar at pH 7.5 and 10.5 [33,34].

In the present study, we took advantage of the possibility of modifying the charge of amino acids, without significantly altering their size nor the properties of the toxin channels, by changes in pH to investigate the ion selectivity of the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac in brush border membrane vesicles isolated from the midgut of *M. sexta*. Toxin-induced permeability to salts of divalent cations and anions was also examined at pH 7.5 and 10.5. The results demonstrate that the pores are cation-selective.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of toxins and brush border membrane vesicles

Cry1Aa and Cry1Ac toxins were produced as insoluble inclusions in *Escherichia coli*, solubilized, trypsin-activated and purified by fast protein liquid chromatography as described earlier [43]. Whole midguts from 5th-instar *M. sexta* larvae (Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC) were freed of attached Malpighian tubules, cut longitudinally to remove the peritrophic membrane and gut contents and rinsed thoroughly with ice-cold 300 mM sucrose, 17 mM Tris/HCl (pH 7.5) and 5 mM EGTA. Brush border membrane vesicles were prepared with a magnesium precipitation and differential centrifugation technique [44].

2.2. Light-scattering assay

Membrane permeability was analyzed using an osmotic swelling technique based on light-scattering measurements [31]. In preparation for the experiments, vesicles were resuspended to about 90% of the desired final volume in 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) or CAPS-KOH (pH 10.5) and allowed to equilibrate overnight at 4°C. At least 1 h before the start of the experiments, they were diluted to a final concentration of 0.4 mg

of membrane protein/ml with the appropriate buffer and enough bovine serum albumin to achieve a final concentration of 1 mg/ml. Vesicles were then incubated with the specified concentration of toxin for 60 min at 23°C and rapidly mixed with an equal volume of a solution composed of 10 mM HEPES–KOH (pH 7.5) or CAPS–KOH (pH 10.5), 1 mg/ml bovine serum albumin and 100 mM L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-serine, L-leucine, L-histidine, L-lysine, L-arginine, MgCl_2 , CaCl_2 , BaCl_2 , K_2SO_4 or potassium phosphate using a stopped-flow apparatus (Hi-Tech Scientific Co., Salisbury, UK). Because Mg^{2+} and Ba^{2+} form insoluble hydroxides at high pH, MgCl_2 and BaCl_2 were only tested at pH 7.5. Scattered light intensity was monitored at a wavelength of 450 nm and a frequency of 10 Hz in a PTI spectrofluorometer (Photon Technology International, South Brunswick, NJ) with a photomultiplier tube located at 90° from the incident light beam. Percent volume recovery was defined as $100(1 - I_t)$, where I_t is the scattered light intensity measured at a given time t relative to the maximum attained in the absence of toxin. Unless specified otherwise, data are means \pm S.E.M. of three experiments, each performed in quintuplicate with a different vesicle preparation. The proportion of the different amino acid and phosphate species at pH 7.5 and 10.5 were calculated from published pK_a values with the Henderson–Hasselbalch equation [45].

3. Results and discussion

3.1. Membrane permeability to amino acids

Vesicles preincubated with Cry1Ac for 60 min were subjected to a hypertonic shock by rapid mixing with an equal volume of 100 mM aspartate or leucine at pH 7.5 (Fig. 1). During the first second, water exit from the vesicles and vesicle shrinking were evidenced by a rapid increase in scattered light intensity. Subsequently, the amino acids, along with water, diffused through the membrane and caused the vesicles to swell as indicated by a decrease in scattered light intensity. The rate and magnitude of vesicle swelling, which depend on substrate permeability, increased with toxin concentration. The initial swelling rates were considerably higher for leucine than for aspartate. In fact, leucine diffused so quickly through the pores that vesicles never shrank to the same extent as in control experiments done without toxin. Permeability to aspartate was

nevertheless substantial since scattered light intensity reached comparable levels for both amino acids after approximately 30 s.

Membrane permeability, measured as percent volume recovery after 3 s, to aspartate, glutamate, serine, leucine, histidine, lysine and arginine was analyzed at pH 7.5 and 10.5 as a function of toxin concentration (Fig. 2). All tested amino acids diffused readily across the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac at both pH values. Toxin-induced permeability was nevertheless much smaller for aspartate and glutamate than for the other amino acids. Osmotic swelling rates were significantly smaller for glutamate (Fig. 2B) than for aspartate (Fig. 2A), in agreement with the presence of an extra methylene group on the side group of glutamate. Nevertheless, both amino acids diffused well across the toxin channels, percent volume recovery reaching values of about 73–84% for aspartate and 27–48% for glutamate after 30 s, at the higher toxin concentrations (100–150 pmol toxin/mg membrane protein), for both toxins and pH values. Also in contrast with aspartate and glutamate, the other five amino acids diffused significantly less rapidly at pH 10.5 than at pH 7.5. Among those tested, aspartate and glutamate are the only amino acids which bear a net negative charge at pH 7.5. The second net negative charge carried by about 76% of aspartate molecules and 78% of glutamate molecules at pH 10.5 did not further decrease their rate of diffusion (Fig. 2A,B). Serine, leucine and histidine are neutral at pH 7.5, but at least 85% of their molecules bear a net negative charge at pH 10.5. The introduction of this negative charge caused a strong decrease in the rate of diffusion of these amino acids (Fig. 2C–E). Lysine and arginine bear a net positive charge at pH 7.5. At the higher pH, lysine become either neutral or negatively charged, in the proportion of about 2/3 and 1/3, and arginine becomes neutral. Thus, removal of a net positive charge also decreased the rate of diffusion of these amino acids (Fig. 2F,G), but its effect was less pronounced than that of adding a negative charge on a neutral molecule such as the previous three amino acids. The above-mentioned light-scattering results thus correlate well with the charge carried by the different amino acids at each pH value and are therefore consistent with the pores formed by the toxins being cation-selective.

Earlier studies dealing with the amino acid permeability of the pores formed by *B. thuringiensis* toxins have yielded somewhat conflicting results. While alanine was

concluded to be permeant [30,46], diffusion of histidine [24] and leucine [25] across toxin pores could not be demonstrated. Our finding that the later two amino acids diffuse readily across the membrane in the presence of Cry1Aa and Cry1Ac was probably facilitated by the fact that much stronger amino acid gradients were used in the light-scattering experiments than in previous measurements of radiolabeled amino acid efflux from vesicles or liposomes.

3.2. *Are amino acid symporters toxin receptors?*

Amino acid symporters, in particular those for leucine [23–26] and histidine [24], have been suggested as possible receptors for Cry1Aa [24–26] and Cry1Ac [23] in the midgut brush border membrane. This hypothesis was first put forward by Reuveni and Dunn [23] to explain why Cry1Ac inhibits more efficiently the uptake of leucine into brush border membrane vesicles than that of aspartic acid. Further evidence in favor of this hypothesis was provided by experiments demonstrating an inhibitory effect of Cry1Aa on amino acid transport measured both in the presence and in the absence of a potassium transmembrane gradient [24–26]. This observation was taken as evidence that the toxins could not inhibit amino acid transport by simply abolishing the potassium gradient and therefore suggested a direct interaction of the toxins with amino acid transporters. Our finding that leucine diffuses more rapidly than aspartate across the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac and that these pores are permeable to a variety of amino acids, however, suggests that earlier results could be explained by a significant amino acid efflux from the vesicles during the filtration and washing steps of the transport experiments. Although our results cannot exclude the possibility that *B. thuringiensis* toxins may interact with amino acid transporters, they suggest a different interpretation of the results on which this hypothesis is based.

3.3. *Membrane permeability to divalent cations and anions*

The properties of the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac were further analyzed by comparing their effects on membrane permeability to the chloride salts of divalent cations (Fig. 3) and the potassium salts of divalent anions (Fig. 4). MgCl_2 , CaCl_2 and BaCl_2 diffused readily across the pores formed by both toxins (Fig. 3), at rates comparable to those previously reported for the chloride salts of the small monovalent

cations K^+ , Na^+ , tetramethylammonium and tetraethylammonium [31,33,34]. Osmotic swelling caused by a dissociated salt depends on the movement of both ion species and is limited by the rate of diffusion of the least permeable ion [31,34]. In the presence of these chloride salts, vesicle swelling rates thus appear to be limited by the rate of diffusion of chloride ion. In agreement with the anion being the rate limiting species, much slower diffusion rates were observed for K_2SO_4 and potassium phosphate at both pH values (Fig. 4) than for the chloride salts of divalent cations (Fig. 3) and the potassium salts of the small monovalent anions Cl^- and SCN^- [31,33,34]. The slow rates of diffusion of potassium phosphate and the fact that they were not influenced by pH (Fig. 4B) are probably mostly due to the predominance of the divalent phosphate species at both pH values since $H_2PO_4^-$ accounts for only about 1/3 of the phosphate ions at pH 7.5 and is absent at pH 10.5. These results indicate that the pores are much more permeable to small monovalent anions than to divalent anions and, in agreement with the results on amino acid permeability, they provide further evidence that the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac are cation-selective.

In the presence of either toxin, pH had little effect on membrane permeability to $CaCl_2$ (Fig. 3B) and K_2SO_4 (Fig. 4A). Because these two salts are always completely dissociated, regardless of pH, these results confirm the validity of our assumption, based on earlier studies [33,34], that the properties of the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac are not influenced to any great extent by changes in pH, at least between pH 7.5 and pH 10.5. Both Cry1Aa [33] and Cry1Ac [34] nevertheless allowed sucrose and raffinose to diffuse faster across the brush border membrane at pH 10.5 than at pH 7.5 in agreement with a slightly larger pore diameter at the higher pH [32]. This increased pore size cannot account for the pH effects observed in the present study. On the contrary, a larger pore size should have allowed the tested solutes to diffuse more readily across the membrane at the higher pH and, in this way, attenuated the differences in swelling rates observed at both pH values.

In contrast with earlier suggestions [35,47] and in agreement with other experiments using brush border membrane vesicles [30,48], calcium (Fig. 3B) and barium (Fig. 3C) diffused very efficiently across the membrane in the presence of Cry1Aa and Cry1Ac and therefore had no detectable inhibiting effect on the pores formed by these toxins.

This is in agreement with previous results that have documented calcium permeability of the pores formed by Cry1Ac in cultured insect cells and in planar lipid bilayers [49].

3.4. Ion selectivity of the pores

The results of the present study all concur to indicate that *B. thuringiensis* toxins form cation-selective pores that allow the passage of a variety of charged and uncharged solutes. This conclusion is consistent with the findings of practically all studies dealing with the properties of the pores formed by these toxins. Several planar lipid bilayer studies have reported reversal potential estimates indicative of cation-selectivity [35-38]. None of these estimates reached the Nernst potential for the cation, however, a strong indication that the anion permeability of the pores is not negligible as demonstrated by a variety of osmotic swelling experiments [27,29,31,33,34]. Cry1C appears to be somewhat exceptional in this respect in being the only toxin for which anion-selective pores have been described, in addition to cation-selective pores [37], and being very active at acidic pH, at least in comparison with Cry1Ac [34]. The pores it forms in Sf9 cells were also found to have a very poor ion selectivity [29].

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche of Quebec.

References

- [1] F. Rajamohan, M.K. Lee, D.H. Dean, *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action, *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 60 (1998) 1–27.
- [2] E. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, D.H. Dean, *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 775–806.
- [3] P.J.K. Knight, N. Crickmore, D.J. Ellar, The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N, *Mol. Microbiol.* 11 (1994) 429–436.
- [4] S. Sangadala, F.S. Walters, L.H. English, M.J. Adang, A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ efflux in vitro, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 10088–10092.
- [5] P.J.K. Knight, B.H. Knowles, D.J. Ellar, Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 17765–17770.
- [6] K. Luo, Y.-J. Lu, M.J. Adang, A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26 (1996) 783–791.
- [7] P. Denolf, K. Hendrickx, J. Van Damme, S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele, J. Van Rie, Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins, *Eur. J. Biochem.* 248 (1997) 748–761.
- [8] K. Luo, J.R. McLachlin, M.R. Brown, M.J. Adang, Expression of a glycosylphosphatidylinositol-linked *Manduca sexta* aminopeptidase N in insect cells, *Protein Exp. Purif.* 17 (1999) 113–122.
- [9] S.S. Gill, E.A. Cowles, V. Francis, Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 27277–27282.
- [10] K. Luo, S. Sangadala, L. Masson, A. Mazza, R. Brousseau, M.J. Adang, The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as ‘receptor A’ by

- mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin binding and pore formation, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27 (1997) 735–743.
- [11] A.P. Valaitis, M.K. Lee, F. Rajamohan, D.H. Dean, Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25 (1995) 1143–1151.
- [12] K.J. Garner, S. Hiremath, K. Lehtoma, A.P. Valaitis, Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29 (1999) 527–535.
- [13] K. Yaoi, T. Kadotani, H. Kuwana, A. Shinkawa, T. Takahashi, H. Iwahana, R. Sato, Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin, *Eur. J. Biochem.* 246 (1997) 652–657.
- [14] G. Hua, K. Tsukamoto, M.-L. Rasilo, H. Ikezawa, Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin, *Gene* 214 (1998) 177–185.
- [15] K. Yaoi, K. Nakanishi, T. Kadotani, M. Imamura, N. Koizumi, H. Iwahana, R. Sato, cDNA cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin binding 120 kDa aminopeptidase N from *Bombyx mori*, *Biochim. Biophys. Acta* 1444 (1999) 131–137.
- [16] K. Luo, B.E. Tabashnik, M.J. Adang, Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*), *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 1024–1027.
- [17] R.K. Vadlamudi, T.H. Ji, L.A. Bulla Jr., A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 12334–12340.
- [18] R.K. Vadlamudi, E. Weber, I. Ji, T.H. Ji, L.A. Bulla Jr., Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5490–5494.
- [19] Y. Nagamatsu, S. Toda, T. Koike, Y. Miyoshi, S. Shigematsu, M. Kogure, Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus*

- thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin, Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (1998) 727–734.
- [20] A.P. Valaitis, J.L. Jenkins, M.K. Lee, D.H. Dean, K.J. Garner, Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity, Arch. Insect Biochem. Physiol. 46 (2001) 186–200.
 - [21] J.-L. Schwartz, Y.-J. Lu, P. Söhnlein, R. Brousseau, R. Laprade, L. Masson, M.J. Adang, Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors, FEBS Lett. 412 (1997) 270–276.
 - [22] Y. Nagamatsu, T. Koike, K. Sasaki, A. Yoshimoto, Y. Furukawa, The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin, FEBS Lett. 460 (1999) 385–390.
 - [23] M. Reuveni, P.E. Dunn, Differential inhibition by *Bacillus thuringiensis* δ endotoxin of leucine and aspartic acid uptake into BBMV from midgut of *Manduca sexta*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 181 (1991) 1089–1093.
 - [24] B. Giordana, M. Tasca, M. Villa, C. Chiantore, G.M. Hanozet, P. Parenti, *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* δ -endotoxin inhibits the K^+ /amino acid cotransporters of lepidopteran larval midgut, Comp. Biochem. Physiol. 106C (1993) 403–407.
 - [25] P. Parenti, M. Villa, G.M. Hanozet, M. Tasca, B. Giordana, Interaction of the insecticidal crystal protein CryIA from *Bacillus thuringiensis* with amino acid transport into brush border membranes from *Bombyx mori* larval midgut, J. Invertebr. Pathol. 65 (1995) 35–42.
 - [26] M.G. Leonardi, P. Parenti, M. Casartelli, B. Giordana, *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa δ -endotoxin affects the K^+ /amino acid symport in *Bombyx mori* larval midgut, J. Membr. Biol. 159 (1997) 209–217.
 - [27] B.H. Knowles, D.J. Ellar, Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity, Biochim. Biophys. Acta 924 (1987) 509–518.

- [28] V. Vachon, M.-J. Paradis, M. Marsolais, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Ionic permeabilities induced by *Bacillus thuringiensis* in Sf9 cells, *J. Membr. Biol.* 148 (1995) 57–63.
- [29] M. Villalon, V. Vachon, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Video imaging analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in Sf9 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1368 (1998) 27–34.
- [30] K. Hendrickx, A. De Loof, H. Van Mellaert, Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut, *Comp. Biochem. Physiol.* 95C (1990) 241–245.
- [31] J. Carroll, D.J. Ellar, An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay, *Eur. J. Biochem.* 214 (1993) 771–778.
- [32] J. Carroll, D.J. Ellar, Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles, *Eur. J. Biochem.* 245 (1997) 797–804.
- [33] F. Coux, V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M. Bes, S. Rivest, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade, R. Frutos, Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 35546–35551.
- [34] L.B. Tran, V. Vachon, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 4488–4494.
- [35] A. Lorence, A. Darszon, C. Díaz, A. Liévano, R. Quintero, A. Bravo, δ -Edotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers, *FEBS Lett.* 360 (1995) 217–222.
- [36] S.L. Slatin, C.K. Abrams, L. English, Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169 (1990) 765–772.
- [37] J.-L. Schwartz, L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau, E. Rousseau, Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and

- anion-selective channels in planar lipid bilayers, *J. Membr. Biol.* 132 (1993) 53–62.
- [38] J.-L. Schwartz, L. Potvin, X.J. Chen, R. Brousseau, R. Laprade, D.H. Dean, Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3978–3984.
- [39] O. Peyronnet, V. Vachon, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane, *J. Membr. Biol.* 184 (2001) 45–54.
- [40] J.A.T. Dow, Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport, *Am. J. Physiol.* 246 (1984) R633–R635.
- [41] J.A.T. Dow, pH gradients in lepidopteran midgut, *J. Exp. Biol.* 172 (1992) 355–375.
- [42] T. Uemura, H. Ihara, A. Wadano, M. Himeno, Fluorometric assay of potential change of *Bombyx mori* midgut brush border membrane induced by δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 (1992) 1976–1979.
- [43] L. Masson, G. Préfontaine, L. Péloquin, P.C.K. Lau, R. Brousseau, Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1, *Biochem. J.* 269 (1989) 507–512.
- [44] M. Wolfersberger, P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, F.V. Sacchi, B. Giordana, G.M. Hanozet, Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*), *Comp. Biochem. Physiol.* 86A (1987) 301–308.
- [45] J.D. Rawn, *Biochemistry*, Neil Patterson Publishers, Burlington, NC, 1989, pp. 58–59.
- [46] M.Z. Haider, D.J. Ellar, Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxin: interaction with phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 978 (1989) 216–222.

- [47] D.N. Crawford, W.R. Harvey, Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*, J. Exp. Biol. 137 (1988) 277–286.
- [48] M.G. Wolfersberger, Neither barium nor calcium prevents the inhibition by *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin of sodium- or potassium gradient-dependent amino acid accumulation by tobacco hornworm midgut brush border membrane vesicles, Arch. Insect Biochem. Physiol. 12 (1989) 267–277.
- [49] L. Potvin, R. Laprade, J.-L. Schwartz, Cry1Ac, a *Bacillus thuringiensis* toxin, triggers extracellular Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular stores in Cfl cells (*Choristoneura fumiferana*, Lepidoptera), J. Exp. Biol. 201 (1998) 1851–1858.

Figure legends

Fig. 1. Osmotic swelling of *M. sexta* midgut brush border membrane vesicles induced by Cry1Ac in the presence of aspartate and leucine. Vesicles preincubated for 60 min with the indicated concentrations of toxin (in pmol toxin/mg membrane protein) in 10 mM HEPES–KOH (pH 7.5) and 1 mg/ml bovine serum albumin were rapidly mixed, using a stopped-flow apparatus, with an equal volume of 100 mM L-aspartic acid (A) or L-leucine (B), 10 mM HEPES–KOH (pH 7.5) and 1 mg/ml bovine serum albumin. Scattered light intensity was monitored at an angle of 90° in a PTI spectrofluorometer. Each trace represents the average of five experiments.

Fig. 2. Permeability of the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac to amino acids. Vesicles were preincubated for 60 min with the indicated concentrations of Cry1Aa (○,●) or Cry1Ac (□,■) in 10 mM HEPES–KOH (pH 7.5) (●,■) or CAPS–KOH (pH 10.5) (○,□) and 1 mg/ml bovine serum albumin and mixed with a solution containing the same buffer supplemented with 100 mM L-aspartic acid (A), L-glutamic acid (B), L-serine (C), L-leucine (D), L-histidine (E), L-lysine (F) or L-arginine (G). Scattered light intensity was monitored as illustrated in Fig. 1 and percent volume recovery after 3 s was calculated as described in Section 2.

Fig. 3. Permeability of the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac to divalent cations. Vesicles were preincubated for 60 min with the indicated concentrations of Cry1Aa (●,○) or Cry1Ac (■,□) in 10 mM HEPES–KOH (pH 7.5) (●,■) or CAPS–KOH (pH 10.5) (○,□) and 1 mg/ml bovine serum albumin and mixed with a solution containing the same buffer supplemented with 100 mM MgCl₂ (A), CaCl₂ (B) or BaCl₂ (C). Scattered light intensity was monitored as illustrated in Fig. 1 and percent volume recovery after 3 s was calculated as described in Section 2.

Fig. 4. Permeability of the pores formed by Cry1Aa and Cry1Ac to divalent anions. Vesicles were preincubated for 60 min with the indicated concentrations of Cry1Aa (●,○) or Cry1Ac (■,□) in 10 mM HEPES–KOH (pH 7.5) (●,■) or CAPS–KOH (pH 10.5) (○,□) and 1 mg/ml bovine serum albumin and mixed with a solution containing the same buffer supplemented with 100 mM K₂SO₄ (A) or potassium phosphate (B).

Scattered light intensity was monitored as illustrated in Fig. 1 and percent volume recovery after 3 s was calculated as described in Section 2.

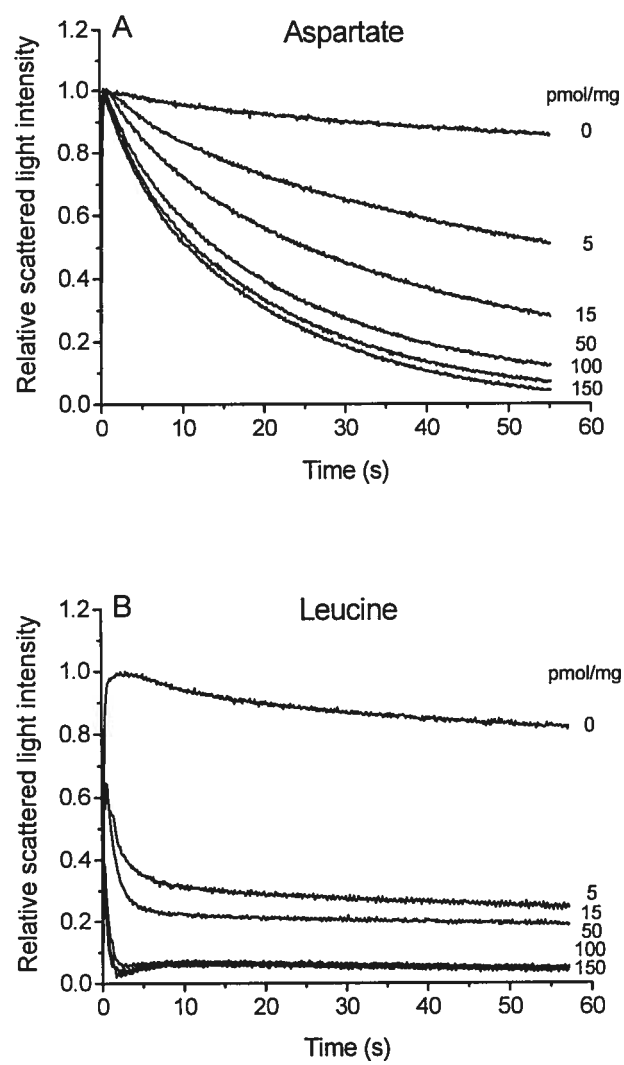
Figure 1

Figure 2

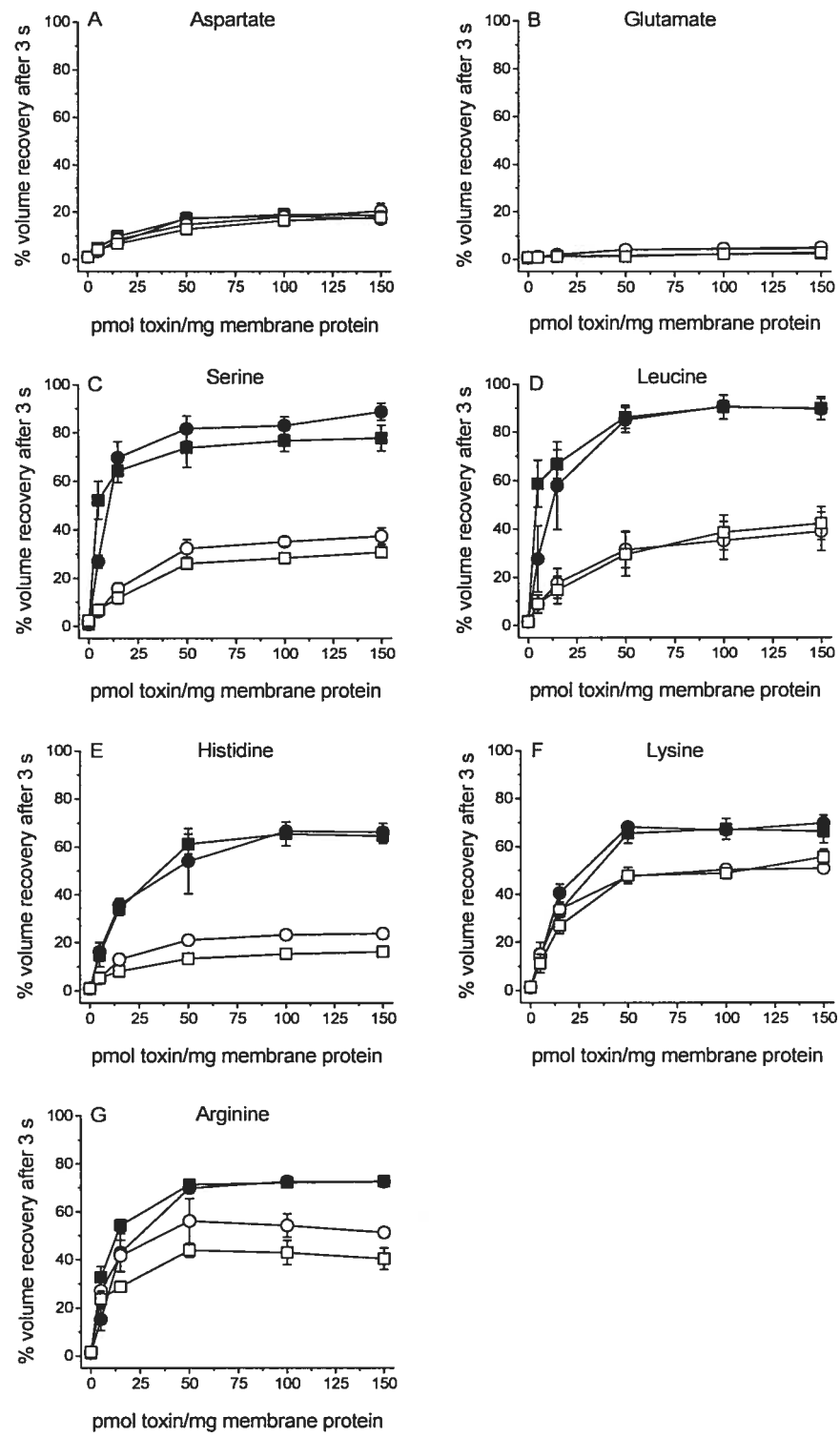


Figure 3

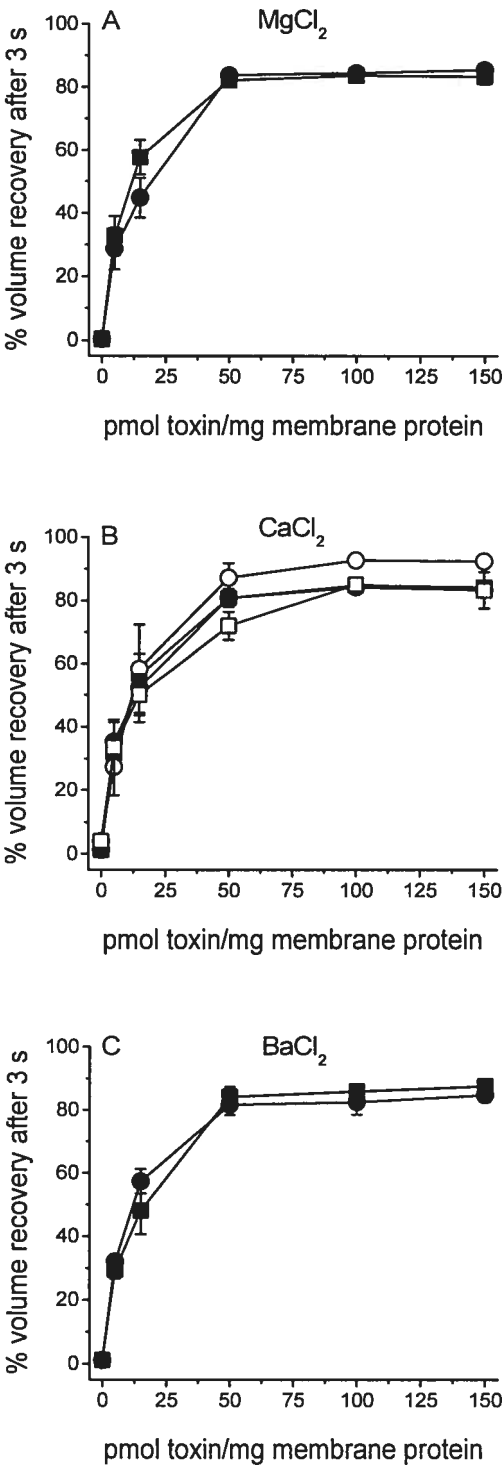
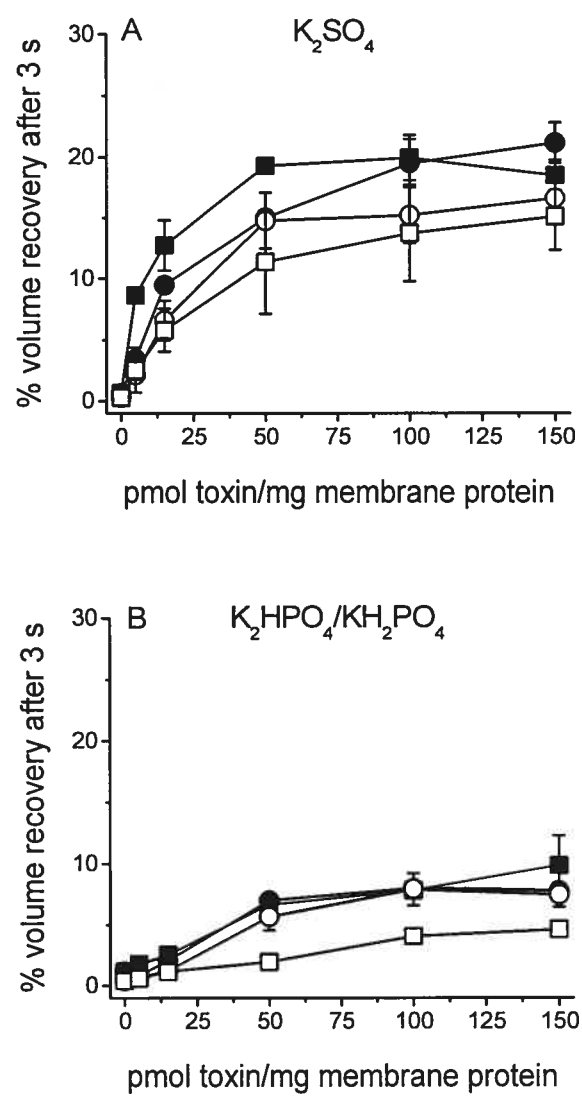


Figure 4

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant

Martin Kirouac

Ph.D. physique – biophysique et physiologie moléculaire

Description de l'article

Titre : Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles

Auteurs : Martin Kirouac, Vincent Vachon, Jean-François Noël, Frédéric Girard, Jean-Louis Schwartz, Raynald Laprade

Revue : Biochimica et Biophysica Acta, avril 2002, vol. 1561, no. 2, pp. 171–179.

Déclaration des coauteurs

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Martin Kirouac inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Effets des toxines insecticides du bacille de Thuringe sur la perméabilité des vésicules de membrane à bordure en brosse intestinale du sphinx du tabac ».

Vincent Vachon :

Date : 21 juin 2006

Raynald Laprade po

Jean-François Noël

Date : 20/06/2006

Frédéric Girard :

Date : 21/06/2006

Jean-Louis Schwartz

Date : 21/06/2006

Raynald Laprade :

Date : 20/06/2006

Permission de l'éditeur

1. Identification de la revue

Biochimica et Biophysica Acta
Elsevier Science Inc.
275 Washington Street
Newton, MA 02458

2. Identification de l'éditeur

Marion Moss
Senior Rights Assistant
Elsevier Ltd
The Boulevard
Langford Lane
Kidlington
Oxford, OX5 1GB

Tél. : +44 1865 843280

Fax : +44 1865 853333

3. Identification de l'article

Titre : Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles

Auteurs : Martin Kirouac, Vincent Vachon, Jean-François Noël, Frédéric Girard, Jean-Louis Schwartz, Raynald Laprade

Référence : Biochimica et Biophysica Acta, avril 2002, vol. 1561, no. 2, pp. 171–179.

Autorisation de M. Moss envoyée par courriel le 3 mai 2006 :

Dear Mr Kirouac,

We hereby grant you permission to reproduce the material [...] at no charge in your thesis [...]

Marion Moss
Senior Rights Assistant

CHAPITRE 4

ANALYSIS OF THE PROPERTIES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* INSECTICIDAL TOXINS USING A POTENTIAL-SENSITIVE FLUORESCENT PROBE

Martin Kirouac, Vincent Vachon, Sébastien Rivest, Jean-Louis Schwartz
et Raynald Laprade

Journal of Membrane Biology 196 (2003) 51–59

RÉSUMÉ

Une sonde fluorescente sensible au potentiel, l'iodure de 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine, et des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées de l'intestin moyen du sphinx du tabac, *Manduca sexta*, ont été utilisées afin d'analyser, à pH 7.5 et 10.5, les effets des toxines de *Bacillus thuringiensis* sur le potentiel membranaire généré par un efflux d'ions K^+ . Les mesures de fluorescence sont fortement influencées par le pH et par la force ionique des solutions. L'effet des toxines a donc été examiné à pH et force ionique constants. Dans ces conditions, les toxines ont peu d'influence sur les niveaux de fluorescence mesurés en présence et en absence de gradients ioniques, ce qui indique que la sélectivité ionique de leurs pores est semblable à celle de la membrane intacte. L'ajout de valinomycine augmente de façon importante le potentiel généré par la diffusion des ions K^+ quoique la perméabilité de la membrane pour les autres ions utilisés afin de maintenir la force ionique constante influence aussi les niveaux de fluorescence mesurés. En présence de valinomycine, les toxines actives (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C et Cry1E) déporalisent efficacement la membrane à pH 7.5 et 10.5.

Analysis of the Properties of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxins
using a Potential-sensitive Fluorescent Probe

M. Kirouac¹, V. Vachon¹, S. Rivest¹, J.-L. Schwartz^{1,2}, R. Laprade¹

¹Groupe d'étude des protéines membranaires and Biocontrol Network, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Centre Ville Station, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

²Biotechnology Research Institute, National Research Council, Montreal, Quebec, H4P 2R2, Canada

Received: 7 May 2003/Revised: 4 September 2003

Running title: Properties of *B. thuringiensis* Toxins

Journal of Membrane Biology, 196 (2003) 51–59.

© Springer-Verlag, New York Inc. 2003.

With kind permission of Springer Science and Business Media.

Correspondence to: R. Laprade; [REDACTED] [REDACTED]

Abstract. A potential-sensitive fluorescent probe, 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, was used to analyze, at pH 7.5 and 10.5, the effects of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential generated by the efflux of K^+ ions from brush border membrane vesicles purified from the midgut of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Fluorescence levels were strongly influenced by the pH and ionic strength of the media. Therefore, characterization of the effects of the toxins was conducted at constant pH and ionic strength. Under these conditions, the toxins had little effect on the fluorescence levels measured in the presence or absence of ionic gradients, indicating that the ionic selectivity of their pores is similar to that of the intact membrane. Valinomycin greatly increased the potential generated by the diffusion of K^+ ions although membrane permeability to the other ions used to maintain the ionic strength constant also influenced fluorescence levels. In the presence of valinomycin, active toxins (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C and Cry1E) efficiently depolarized the membrane at pH 7.5 and 10.5.

Key words: Insecticidal toxins – Membrane potential – Brush border membrane vesicles – diS-C₃(5) – *Bacillus thuringiensis* – *Manduca sexta*

Introduction

Bacillus thuringiensis is a widely used alternative to chemical insecticides for the control of insect pests. During sporulation, this Gram-positive bacterium produces crystalline parasporal inclusion bodies containing insecticidal proteins (δ -endotoxins). Following their ingestion by insect larvae, the proteins are solubilized and converted to active toxins by midgut proteases. Activated toxins act by forming pores after binding to specific receptors at the surface of the insect midgut luminal membrane [22, 37, 38].

The pH of the lepidopteran midgut lumen varies from about 8 to above 12 depending on species and region of the midgut [9, 10]. The alkaline and reducing conditions found in the lepidopteran midgut play an important role in the solubilization of the crystals and proteolytic activation of the toxins [1, 19]. High pH is also thought to play an important role in the activity of the activated toxins [37, 38, 56], although most previous studies have been carried out at near neutral pH values. Recently, however, the effect of alkaline pH was found to vary considerably for different toxins [45].

The pores formed by *B. thuringiensis* toxins have been shown, using different experimental approaches, to allow the passage of a variety of neutral and charged solutes [6–8, 15, 21, 23, 45, 48, 49, 52]. They are nevertheless recognized as being cation-selective [21, 26, 39–41, 43, 47], although anion-selective pores have also been observed at pH 6.0 [39]. Fluorescence measurements using a membrane potential-sensitive probe, 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide (diS-C₃(5)), have been used to characterize pore formation by *B. thuringiensis* toxins in insect brush border membrane vesicles [26, 47]. Conclusions drawn from such experiments, regarding the biophysical properties of the pores, were based on the assumption that the observed changes in fluorescence were due exclusively to changes in membrane potential. Other factors, such as pH and ionic strength, could nevertheless influence fluorescence measurements by altering the state of aggregation of the dye and the extent of dye binding to membranes and proteins [16, 53, 58].

In the present study, fluorescence measured with diS-C₃(5) and vesicles isolated from the midgut of *Manduca sexta* was shown to be strongly influenced by these factors and non-linearly related to membrane potential. The intrinsic cationic selectivity of the membrane was poorly affected by the toxins, but could be increased substantially by

addition of the K^+ ionophore, valinomycin. Active toxins efficiently reduced the membrane potential generated by valinomycin-induced efflux of K^+ ions from the vesicles, at both pH 7.5 and 10.5.

Materials and methods

PREPARATION OF MEMBRANE VESICLES

Whole midguts were isolated from 5th-instar *M. sexta* larvae (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC), freed of attached Malpighian tubules and luminal contents, rinsed thoroughly with ice-cold 300 mM sucrose, 17 mM Tris/HCl (pH 7.5) and 5 mM EGTA, and stored at -80°C until use. Brush border membrane vesicles were prepared as described previously [57]. The final membrane preparation was resuspended in 10 mM Hepes/KOH (pH 7.5) and stored at -80°C until use. In preparation for the experiments, vesicles were centrifuged at $12,200 \times g$ for 20 min, resuspended at 2.0 mg protein/ml in the solution with which they were to be loaded, as specified in the figure legends, and allowed to equilibrate overnight at 4°C . Vesicles were kept at 4°C until injected into the spectrometer cuvette, except in the case where a 60 min incubation at room temperature was performed.

TOXINS

Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C and Cry1E toxins were produced as insoluble inclusions in *Escherichia coli*, solubilized, trypsin-activated, and purified by fast protein liquid chromatography as described earlier [29].

FLUORESCENCE MEASUREMENTS

Fluorescence measurements were carried out at 23°C in a Spex Fluorolog CM-3 spectrofluorometer (Jobin Yvon Horiba, Edison, NJ) at a frequency of 10 Hz, an excitation wavelength of 620 nm and an emission wavelength of 670 nm. Polystyrene cuvettes containing $1.5 \mu\text{M}$ of diS-C₃(5) (Molecular Probes, Eugene, OR), from a 1 mM stock solution in dimethyl sulfoxide, and the appropriate buffer solution, as specified in the figure legends, were stirred for 10 min, in the dark, before each experiment, to allow fluorescence to reach a steady level [17, 42]. A few seconds after the beginning of the

recording, vesicles were injected into the cuvette at a final concentration of 10 μg protein/ml. In some experiments, 7.5 μM valinomycin (Sigma, St. Louis, MO) was added to the cuvette, from a 5 mM stock solution in ethanol. Fluorescence values were normalized relative to the level measured before adding the vesicles. For each experimental condition tested, the fluorescence level attained in the absence of a membrane potential was measured by injecting vesicles into the same solution as that with which they were loaded. Unless specified otherwise, data are means \pm SEM of 3 experiments, each performed with a different vesicle preparation. Experimental values for each individual experiment consisted of the average of four replicates obtained using the same vesicle preparation. Statistical comparisons were made with the two-tailed unpaired t test.

Results

FLUORESCENCE MEASUREMENTS ARE INFLUENCED BY pH AND IONIC STRENGTH

Vesicles loaded with 150 mM KCl were first injected into cuvettes containing either an isotonic solution of sucrose or the same solution as that with which they were loaded (Fig. 1A). This provided a measurement of the fluorescence levels attained in the presence and absence of a membrane potential. At both pH 7.5 and 10.5, a stronger decrease in fluorescence intensity was observed in the presence of a membrane potential than in its absence, as expected when using a potential-sensitive dicarbocyanine probe. Preferential efflux of potassium ions, relative to chloride ions, generates an inside-negative potential which causes the positively charged dye to accumulate within the vesicles and associate with their membrane. Concentration of the dye results in fluorescence quenching due to the aggregation of dye molecules [36, 42, 53]. The generation of an inside-negative membrane potential (Fig. 1A) confirms that the membrane has a higher permeability to K^+ than to Cl^- ions [26, 35].

A much more substantial drop in fluorescence was observed at pH 10.5 than at pH 7.5, following the injection of vesicles (Fig. 1A). The fluorescence of diS-C₃(5) is known to be independent of pH in solution, but strongly pH-dependent in the presence of cells or cell membranes [11, 16, 53]. A direct effect of pH on the fluorescence of the dye itself would not be apparent in the figures presented herein because of the normalization

of the data. The difference between fluorescence levels observed at pH 7.5 and pH 10.5 can therefore be attributed to an alteration of the proportion of dye molecules that bind to the vesicles, due to the titration of charges at the surface of the membrane.

To examine the additional possibility of an effect of ionic strength, a series of experiments similar to that illustrated in Fig. 1*A* was performed with vesicles loaded with different concentrations of KCl and injected in isotonic solutions of sucrose (Fig. 1*B*). Under these conditions and according to the Goldman–Hodgkin–Katz equation, membrane potential depends on the ratio of intravesicular and extravesicular KCl concentrations. Because under each set of experimental conditions an equal volume of vesicles was injected in the cuvettes, the final ratio of intravesicular and extravesicular KCl concentrations was constant and either equal to 1, in the absence of a membrane potential (*open bars*), or to approximately 150, under conditions used to generate a membrane potential (*hatched bars*), independently of the ionic strength. Fluorescence levels decreased markedly as the ionic strength of the solution was decreased, at both pH values (Fig. 1*B*). This effect was more pronounced in the absence of membrane potential (*open bars*), where ionic strength is varied in both the intravesicular and extravesicular solutions, than in its presence (*hatched bars*), where ionic strength is varied inside the vesicles, but very little in the extravesicular milieu.

MEMBRANE PERMEABILITY TO IONS OTHER THAN K^+

Given this strong effect of ionic strength, similar experiments were carried out under conditions where ionic strength was maintained constant and equal on both sides of the membrane with tetramethylammonium chloride (TMACl) (Fig. 2*A*). In the absence of a membrane potential (*open bars*), the decrease in fluorescence levels with decreasing KCl concentration was greatly attenuated in comparison with that observed in the previous experiment (Fig. 1). In the presence of a membrane potential generated by a K^+ concentration ratio of approximately 150, however, fluorescence levels increased gradually as the KCl concentration was decreased (*hatched bars*, Fig. 2*A*). This result is in contradiction with the Nernst equation, but consistent with the Goldman–Hodgkin–Katz equation, indicating that the membrane has a non-negligible permeability to either Cl^- or TMA^+ ions or both.

Under conditions of constant ionic strength, the difference between the fluorescence levels measured in the presence and absence of a membrane potential was also considerably reduced, suggesting that the potential generated was relatively small. The membrane potential generated by the efflux of K^+ ions was nevertheless greatly increased in the presence of the K^+ ionophore valinomycin, as evidenced by the much larger differences observed between the fluorescence values measured under conditions designed to generate a potential (*hatched bars*) or not (*open bars*) (Fig. 2B). As was observed in the absence of valinomycin, these differences were also gradually attenuated as the K^+ concentration was reduced, indicating that even in the presence of valinomycin, the membrane permeability to TMA^+ or Cl^- or both is non-negligible. Transmembrane potentials generated in the presence of valinomycin and estimated from fluorescence measurements were not increased by replacing TMACl by the chloride salts of either sodium, guanidinium, choline or N-methyl-D-glucamine (NMDGCl), or by tetramethylammonium gluconate (*data not shown*).

RELATIONSHIP BETWEEN FLUORESCENCE AND K^+ TRANSMEMBRANE GRADIENT

Evidence for a complex relationship between fluorescence and membrane potential is apparent from calibration curves obtained at constant ionic strength in the presence of valinomycin (Fig. 3). Relative fluorescence intensity varied as a sigmoid-like function of the logarithm of the intravesicular to extravesicular K^+ concentration ratio (K_i/K_o), both at pH 7.5 and 10.5. This relation clearly contrasts with the Nernst equation, since a linear relationship is only observed at K_i/K_o ratios of up to approximately 5. For larger ratios, up to about 30, the slope of the curve gradually becomes steeper. Finally, for still larger ratios, the slope levels off gradually and monotonously due to the conductance of the membrane to ions other than K^+ , as predicted by the Goldman–Hodgkin–Katz equation. Although non-linear calibration curves are not uncommonly found with a variety of cyanine dyes [4, 11, 17, 33, 46], linear relationships have been reported for experiments performed with diS-C₃(5) and brush border membrane vesicles isolated from the midguts of lepidopteran insects [26, 47]. These latter calibration curves, however, extended over a narrower range of intravesicular to extravesicular K^+ ratios than those

shown in Fig. 3, thus excluding the higher K^+ ratios at which the curves depart most from linearity.

Considering the complexity of the calibration curves, it appears hazardous to calculate membrane potentials from such fluorescence measurements, especially in the absence of reliable data on the permeabilities of the different ionic species present. However, reliable values can be obtained for fluorescence levels corresponding to the linear region of the calibration curve. For instance, at pH 7.5 in the absence of valinomycin (Fig. 2A), membrane potentials of -43 , -25 and -11 mV are obtained for the conditions where the vesicles were loaded with 150 mM KCl, 80 mM KCl/70 mM TMAcI and 10 mM KCl/140 mM TMAcI, respectively. These potentials are in good agreement with the low K^+ selectivity reported for the intrinsic channels of the brush border membrane of *Spodoptera frugiperda* ($P_K/P_{Cl} \sim 5.7$) [26] and *Lymantria dispar* ($P_K/P_{Cl} = 1.5\text{--}8.0$) [35]. Indeed, using the mean P_K/P_{Cl} permeability ratio reported for the ionic channels found in the brush border of *L. dispar*, $P_K/P_{Cl} \cong 4.3$ [35], and assuming, for the sake of simplicity, a negligible permeability for TMA^+ ions, the Goldman–Hodgkin–Katz equation predicts potentials of -42 , -30 and -6 mV, respectively, for the experimental conditions described above.

EFFECT OF *B. THURINGIENSIS* TOXINS

Five *B. thuringiensis* toxins, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C and Cry1E, which are active against *M. sexta*, and Cry1B, which is inactive against the same insect [18, 50, 51], were first assayed for their effects on membrane potential by injecting vesicles, loaded with KCl and preincubated for an hour with one of the toxins, into cuvettes containing an isotonic solution of TMAcI, in the absence of valinomycin (Figs. 4A and B). At both pH 7.5 and 10.5, all toxins tested had little effect on the small membrane potential generated by the outwardly-directed 150 mM K^+ gradient. Similar results were obtained when TMAcI was replaced by NMDGCl (Fig. 4C), although experiments with this latter salt were only carried out at pH 7.5 because the N-methyl-D-glucamine ion, which has a pKa of 9.62 [20], is predominantly uncharged at pH 10.5. Despite similar conditions, Fig. 4A and 4B (no toxin) show somewhat smaller membrane potentials than Fig. 2A (150 mM KCl). This difference appears to result from the fact that, in the

experiments presented in Fig. 4, the vesicles were preincubated for 60 min at room temperature before the fluorescence measurements. This incubation appears to slightly, but consistently, modify the ionic selectivity of the membrane and thus slightly reduce the potential generated. In agreement with this conclusion, rundown of intrinsic brush border membrane channels has been previously reported [26, 35].

On the other hand, in the presence of valinomycin, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C and Cry1E caused a strong and dose-dependent increase in fluorescence corresponding to a decrease in membrane potential at both pH values (Fig. 5). In contrast, the non-toxic Cry1B [18] was unable to depolarize the membrane.

Similar results were obtained at pH 7.5 in the presence of NMDGCl instead of TMAcI (*data not shown*). Noteworthy is the fact that among active toxins, Cry1C appears relatively insensitive to pH while the other toxins show a lower activity at pH 10.5 than at pH 7.5. The saturation of the curves around 50 pmol toxin/mg membrane protein shows that there is a limited number of toxin molecules that can insert into the membrane and form pores, due to the presence of a finite number of binding sites. It is also interesting to note that the toxins were not able to depolarize the membrane completely, showing that the membrane permeability induced by the toxins to the different ions does not overcome that of valinomycin for K^+ ions.

Discussion

The results of the present study demonstrate that membrane potential measurements using a fluorescent probe, in insect midgut brush border membrane vesicles, are strongly influenced by pH and ionic strength, as previously reported for other systems [16, 53, 58]. Keeping these factors constant allowed the design of an efficient and reliable method for assaying the pore-forming activity of *B. thuringiensis* toxins. Using this assay, membrane permeability was shown to be slightly greater for K^+ than for Cl^- ions, as previously reported [26, 35]. The present study also demonstrates that active toxins have little effect on the small membrane potentials generated by K^+ efflux from intact vesicles, but strongly reduces the larger potentials generated in the presence of valinomycin.

The fact that membrane potential is increased substantially in the presence of valinomycin may suggest that this factor could modulate the properties of the pores formed by these toxins. Although this possibility cannot be excluded, membrane potential is clearly not required for toxin activity since these proteins can increase considerably the permeability of brush border membrane vesicles in its absence, as observed in light scattering experiments performed with non-electrolytes [6, 8, 45, 49]. Therefore, in the absence of valinomycin, the lack of a strong effect of the toxins on membrane potential, despite the large increase in permeability, indicates that the ionic selectivity of the pores formed by *B. thuringiensis* toxins does not differ significantly from that of the midgut brush border membrane. In agreement with this observation, similar reversal potentials were reported for the endogenous channels of insect midgut brush border membranes fused to planar lipid bilayers [26, 35] and for those formed by toxins in these membranes [26]. Our results are also consistent with the fact that the pores formed by *B. thuringiensis* toxins, despite having a measurable cation selectivity [21, 26, 39–41, 43, 49], allow the passage of a variety of cations and anions across the membrane [6–8, 15, 21, 23, 45, 48, 49, 52]. Active toxins increase not only the efflux of K^+ ions from the vesicles, but also the influx of TMA^+ or $NMDG^+$ and the efflux of Cl^- , thus preventing the generation of a strong membrane potential. In the midgut epithelium, membrane potential and a strong potassium electrochemical gradient are generated by a vacuolar-type proton ATPase coupled with a K^+/H^+ antiporter [54, 55]. Both are efficiently abolished in the presence of the poorly selective pores formed by the toxins [24, 34]. In the midgut, the toxins clearly act by increasing membrane permeability to various ions rather than by modifying the membrane's ionic selectivity (Fig. 4). Accordingly, active toxins completely abolish membrane potential in isolated midguts [34] but only partially in experiments performed with brush border membrane vesicles (Fig. 5). In these latter experiments, the final potential depends on the relative contribution of intrinsic membrane channels, toxin, and ionophore to the permeability and ionic selectivity of the membrane.

The above finding of a negligible effect of toxins on membrane potential, in the absence of an artificial membrane potential generated by an ionophore, contradicts those of previous reports in which it was concluded that *B. thuringiensis* toxins cause either a

hyperpolarization [2, 3, 12, 13, 25, 26, 30–32, 44, 47, 59] or a depolarization [25, 26] in lepidopteran insect midgut brush border membrane vesicles. Furthermore, while in our experiments fluorescence was measured after the vesicles had preincubated for one hour with the toxins, to allow ample time for the pores to form, in most previous fluorescence studies [2, 3, 12, 13, 25, 26, 30–32, 44, 59], the observed changes in fluorescence occurred instantaneously upon addition of the toxin to the vesicles. In our hands, injection of toxin into cuvettes, after fluorescence levels were allowed to stabilize following the addition of the vesicles, never caused more than extremely small changes in fluorescence, comparable to the noise level observed in traces such as those shown in Fig. 1A. Rapid hyperpolarization was only observed when valinomycin was added instead of toxin. The absence of an instantaneous effect of *B. thuringiensis* toxins is in agreement with the results of numerous other studies, using different experimental systems, in which toxin-induced increases in membrane permeability only became apparent after approximately 10 seconds to several minutes [5, 6, 8, 14, 24, 34, 45, 48, 49].

In most previous fluorescence studies [2, 3, 12, 13, 25, 26, 31, 32, 44, 59], conclusions regarding the pore-forming ability of *B. thuringiensis* toxins as well as the properties of their pores were based on comparisons of the slopes of curves obtained by plotting changes in fluorescence levels, that occur in response to sequential additions of KCl to the vesicle suspension, against the K^+ equilibrium potential, calculated with the Nernst equation. Such calculations, however, are based on the assumption that the membrane has a negligible permeability to all ions except K^+ . This assumption is not only contradicted by the results of the present study, but is also, in principle, incompatible with the data from light-scattering experiments in which osmotic swelling, in the presence of a salt, can only be detected if the membrane is permeable to both the anion and the cation [6, 21, 45]. In addition, sequential addition of KCl not only modifies the ionic strength of the solution in which the vesicles are suspended, but also its osmolarity. As clearly demonstrated in the present study, fluorescence levels are strongly affected by changes in ionic strength. Also changes in osmolarity undoubtedly bring about modifications in the volume of the vesicles and, consequently, in the intravesicular KCl concentrations on which calculations of K^+ equilibrium potentials are

based. Because active toxins increase considerably the permeability of the membrane for KCl, such osmotic effects must be more pronounced in control vesicles than in those in which toxins are inserted. Finally, a clear indication that fluorescence measured under these conditions does not depend exclusively on membrane potential is apparent from the figures of several studies [2, 3, 26, 31, 32, 44] in which substantially different fluorescence levels are reported for measurements carried out under conditions where membrane potential must be equal to zero since identical K^+ concentrations are present on both sides of the membrane.

Although, in the present study, toxins had little effect on the membrane potential generated in intact vesicles, they strongly reduced the potential generated in the presence of valinomycin, indicating that the magnitude of the membrane permeability induced by the toxin is comparable to that of the ionophore although the ionic selectivity of the toxin pores is much smaller. The depolarizing effects of the toxins observed in the presence of valinomycin (Fig. 5) are qualitatively in agreement with published bioassay data [18, 50, 51], but do not reflect the approximately 4- to 12-fold higher LC_{50} values reported for Cry1C and Cry1E than for Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac. Although several other cases have been described in which toxins readily form pores in brush border membrane vesicles [8, 27, 45, 49], isolated larval midguts [34] or dissociated midgut epithelial cells [28], despite a relatively modest toxicity toward larvae of the corresponding insect species, such differences remain to be explained. On the other hand, the effect of Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, and Cry1E, as measured by the present fluorescence assay (Fig. 5), correlates well with the toxins' pore-forming ability evaluated previously, using a light scattering assay [45]. However, the lower pore-forming ability observed for Cry1C at pH 10.5 using the latter assay [45], was not observed with the current fluorescence assay. In fact, the fluorescence levels measured in the presence of Cry1C at pH 10.5 were significantly higher ($p < 0.05$) than those measured with the other five toxins. The major differences between light scattering and fluorescence measurements are the magnitude and direction of the membrane potentials generated, and the fact that preincubation of the vesicles with the toxins is done at low ionic strength for light scattering experiments and at high ionic strength for fluorescence experiments. Pore formation by Cry1C, and possibly other toxins, as well as the effect of

pH on their activity, could therefore be influenced by the ionic strength of the buffer solutions and the membrane potential. These results stress the need for a detailed analysis of the effects of various physico-chemical factors found in the midgut lumen, including not only ionic strength and membrane potential, but also the presence of midgut proteases, for a better understanding of the mode of action of *B. thuringiensis* toxins.

In conclusion, the results of the present study illustrate the influence of pH and ionic strength on the measurements made with a membrane potential fluorescent probe on insect midgut brush border membrane vesicles and show that the relation between the fluorescence and membrane potential is relatively complex. However, taking these factors into account allowed the design of an improved fluorometric method for assaying toxin activity and studying the properties of their pores.

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT). M. Kirouac received a graduate student scholarship from the FQRNT.

References

1. Bietlot, H.P.L., Vishnubhatla, I., Carey, P.R., Pozsgay, M., Kaplan, H. 1990. Characterization of the cysteine residues and disulfide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **267**:309–315
2. Bravo, A., Miranda, R., Gómez, I., Soberón, M. 2002. Pore formation activity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. *Biochim. Biophys. Acta* **1562**:63–69
3. Bravo, A., Sánchez, J., Kouskoura, T., Crickmore, N. 2002. N-Terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J. Biol. Chem.* **277**:23985–23987
4. Burckhardt, G. 1977. Non-linear relationship between fluorescence and membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* **468**:227–237
5. Butko, P., Cournoyer, M., Pusztai-Carey, M., Surewicz, W.K. 1994. Membrane interactions and surface hydrophobicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1C. *FEBS Lett.* **340**:89–92
6. Carroll, J., Ellar, D.J. 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* **214**:771–778
7. Carroll, J., Ellar, D.J. 1997. Analysis of the large aqueous pores produced by *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* **245**:797–804
8. Coux, F., Vachon, V., Rang, C., Moozar, K., Masson, L., Royer, M., Bes, M., Rivest, S., Brousseau, R., Schwartz, J.-L., Laprade, R., Frutos, R. 2001. Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* **276**:35546–35551
9. Dow, J.A.T. 1984. Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.* **246**:R633–R635
10. Dow, J.A.T. 1992. pH gradients in lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* **172**:355–375

11. Freedman, J.C., Hoffman, J.F. 1979. The relation between dicarbocyanine dye fluorescence and the membrane potential of human red blood cells set at varying Donnan equilibria. *J. Gen. Physiol.* **74**:187–212
12. Garcia-Robles, I., Sánchez, J., Gruppe, A., Martínez-Ramírez, A.C., Rausell, C., Real, M.D., Bravo, A. 2001. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**:849–856
13. Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**:242–246
14. Guihard, G., Vachon, V., Laprade, R., Schwartz, J.-L. 2000. Kinetic properties of the channels formed by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein Cry1C in the plasma membrane of Sf9 cells. *J. Membrane Biol.* **175**:115–122
15. Hendrickx, K., De Loof, A., Van Mellaert, H. 1990. Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. *Comp. Biochem. Physiol.* **95C**:241–245
16. Hladky, S.B., Rink, T.J. 1976. Potential difference and the distribution of ions across the human red blood cell membrane: a study of the mechanism by which the fluorescent cation, diS-C₃-(5) reports membrane potential. *J. Physiol.* **263**:287–319
17. Hoffman, J.F., Laris, P.C. 1974. Determination of membrane potentials in human and *Amphiuma* red blood cells by means of a fluorescent probe. *J. Physiol.* **239**:519–552
18. Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houtven, A., Vanderbruggen, H., Vaeck, M. 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2010–2017
19. Jaquet, F., Hütter, R., Lüthy, P. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:500–504

20. Jencks, W.P., Regenstein, J. 1970. Ionization constants of acids and bases. *In: Handbook of Biochemistry. Selected Data for Molecular Biology*, 2nd ed. H.A. Sober, Editor, pp. J187–J226. CRC Press, Cleveland, OH
21. Kirouac, M., Vachon, V., Noël, J.-F., Girard, F., Schwartz, J.-L., Laprade, R. 2002. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1561**:171–179
22. Knowles, B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* **24**:275–308
23. Knowles, B.H., Ellar, D.J. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **924**:509–518
24. Liebig, B., Stetson, D.L., Dean, D.H. 1995. Quantification of the effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on short-circuit current in the midgut of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **41**:17–22
25. Lorence, A., Darszon, A., Bravo, A. 1997. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Lett.* **414**:303–307
26. Lorence, A., Darszon, A., Díaz, C., Liévano, A., Quintero, R., Bravo, A. 1995. δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **360**:217–222
27. Luo, K., Banks, D., Adang, M.J. 1999. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:457–464
28. Masson, L., Mazza, A., Gringorten, L., Baines, D., Aneliunas, V., Brousseau, R. 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* **14**:851–860
29. Masson, L., Préfontaine, G., Péloquin, L., Lau, P.C.K., Brousseau, R. 1989. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of

- Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* **269**:507–512
30. Meza, R., Nuñez-Valdez, M.-E., Sanchez, J., Bravo, A. 1996. Isolation of Cry1Ab protein mutants of *Bacillus thuringiensis* by a highly efficient PCR site-directed mutagenesis system. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**:333–339
 31. Miranda, R., Zamudio, F.Z., Bravo, A. 2001. Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**:1155–1163
 32. Nuñez-Valdez, M.-E., Sánchez, J., Lina, L., Güereca, L., Bravo, A. 2001. Structural and functional studies of α -helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin. *Biochim. Biophys. Acta* **1546**:122–131
 33. Parthasarathy, R., Harvey, W.R. 1994. Potential differences influence amino acid/ Na^+ symport rates in larval *Manduca sexta* midgut brush-border membrane vesicles. *J. Exp. Biol.* **189**:55–67
 34. Peyronnet, O., Vachon, V., Brousseau, R., Baines, D., Schwartz, J.-L., Laprade, R. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1679–1684
 35. Peyronnet, O., Vachon, V., Schwartz, J.-L., Laprade, R. 2000. Ion channel activity from the midgut brush-border membrane of gypsy moth (*Lymantria dispar*) larvae. *J. Exp. Biol.* **203**:1835–1844
 36. Plášek, J., Sigler, K. 1996. Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. *J. Photochem. Photobiol. B* **33**:101–124
 37. Rajamohan, F., Lee, M.K., Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **60**:1–27
 38. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775–806

39. Schwartz, J.-L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R., Rousseau, E. 1993. Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membrane Biol.* **132**:53–62
40. Schwartz, J.-L., Lu, Y.-J., Söhnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L., Adang, M.J. 1997. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* **412**:270–276
41. Schwartz, J.-L., Potvin, L., Chen, X.J., Brousseau, R., Laprade, R., Dean, D.H. 1997. Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3978–3984
42. Sims, P.J., Waggoner, A.S., Wang, C.-H., Hoffman, J.F. 1974. Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* **13**:3315–3330
43. Slatin, S.L., Abrams, C.K., English, L. 1990. Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**:765–772
44. Soberón, M., Pérez, R.V., Nuñez-Valdez, M.E., Lorence, A., Gómez, I., Sánchez, J., Bravo, A. 2000. Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**:221–225
45. Tran, L.B., Vachon, V., Schwartz, J.-L., Laprade, R. 2001. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4488–4494
46. Tsien, R.Y., Hladky, S.B. 1978. A quantitative resolution of the spectra of a membrane potential indicator, diS-C₃-(5), bound to cell components and to red blood cells. *J. Membrane Biol.* **38**:73–97
47. Uemura, T., Ihara, H., Wadano, A., Himeno, M. 1992. Fluorometric assay of potential change of *Bombyx mori* midgut brush border membrane induced by δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**:1976–1979

48. Vachon, V., Paradis, M.-J., Marsolais, M., Schwartz, J.-L., Laprade, R. 1995. Ionic permeabilities induced by *Bacillus thuringiensis* in Sf9 cells. *J. Membrane Biol.* **148**:57–63
49. Vachon, V., Préfontaine, G., Coux, F., Rang, C., Marceau, L., Masson, L., Brousseau, R., Frutos, R., Schwartz, J.-L., Laprade, R. 2002. Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry* **41**:6178–6184
50. Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* **186**:239–247
51. Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1378–1385
52. Villalon, M., Vachon, V., Brousseau, R., Schwartz, J.-L., Laprade, R. 1998. Video imaging analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in Sf9 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1368**:27–34
53. Waggoner, A.S. 1979. Dye indicators of membrane potential. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **8**:47–68
54. Wieczorek, H., Putzenlechner, M., Zeiske, W., Klein, U. 1991. A vacuolar-type proton pump energizes K^+/H^+ antiport in an animal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **266**:15340–15347
55. Wieczorek, H., Weerth, S., Schindlbeck, M., Klein, U. 1989. A vacuolar-type proton pump in a vesicle fraction enriched with potassium transporting plasma membranes from tobacco hornworm midgut. *J. Biol. Chem.* **264**:11143–11148
56. Wolfersberger, M.G. 1995. Permeability of *Bacillus thuringiensis* CryI toxin channels. In: Molecular Action of Insecticides on Ion Channels. J.M. Clark, Editor, pp. 294–301. American Chemical Society, Washington, DC
57. Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F.V., Giordana, B., Hanozet, G.M. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid

- transporting brush border membrane vesicles from larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**:301–308
58. Wright, E.M. 1984. Electrophysiology of plasma membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **246**:F363–F372
59. Zhuang, M., Oltean, D.I., Gómez, I., Pullikuth, A.K., Soberón, M., Bravo, A., Gill, S.S. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* **277**:13863–13872

Figure legends

Fig. 1. Effect of ionic strength. (A) The vesicles were loaded with 150 mM KCl and 10 mM of either HEPES/tetramethylammonium hydroxide (TMAOH) (pH 7.5) or CAPS/TMAOH (pH 10.5). At the time indicated by the arrow, vesicles were injected into cuvettes containing either the same solution as that with which they were loaded (KCl) or 300 mM sucrose (*Suc*) and 10 mM of either HEPES/TMAOH (pH 7.5) or CAPS/TMAOH (pH 10.5). Each trace corresponds to the average of 4 experiments performed with the same vesicle suspension. (B) The vesicles were loaded with KCl at the indicated concentrations and 10 mM of either HEPES/TMAOH (pH 7.5) or CAPS/TMAOH (pH 10.5) and injected into cuvettes containing either the same solution as that with which the vesicles were loaded (*open bars*) or an isotonic solution of sucrose (*hatched bars*). Data are means \pm SEM of the minimum relative fluorescence recorded after injection of the vesicles, measured in 3 experiments, each performed in quadruplicate with a different vesicle preparation. Means labeled with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Fig. 2. Effect of valinomycin. Vesicles were loaded with the indicated concentrations of KCl and TMACl (in mM) and 10 mM of either HEPES/TMAOH (pH 7.5) or CAPS/TMAOH (pH 10.5). They were injected into solutions identical to those with which they were loaded (*open bars*) or in 150 mM TMACl and 10 mM of either HEPES/TMAOH (pH 7.5) or CAPS/TMAOH (pH 10.5) (generating an intravesicular/extravesicular K^+ ratio of approximately 150, *hatched bars*). Experiments were carried out either without valinomycin (A) or with 7.5 μ M of the ionophore (B). Means labeled with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Fig. 3. Calibration of fluorescence as a function of the transmembrane potassium concentration ratio. Vesicles were loaded with 150 mM KCl and 10 mM of either HEPES/TMAOH (pH 7.5) or CAPS/TMAOH (pH 10.5). They were injected into cuvettes containing the appropriate concentration of KCl, enough TMACl to maintain osmolarity and ionic strength constant, 7.5 μ M valinomycin and 10 mM of either HEPES/TMAOH (pH 7.5) (●) or CAPS/TMAOH (pH 10.5) (■).

Fig. 4. Effects of *B. thuringiensis* toxins on the membrane potential of *M. sexta* brush border membrane vesicles. The vesicles were loaded with 150 mM KCl and 10 mM of either HEPES/TMAOH (pH 7.5) (*A,C*) or CAPS/TMAOH (pH 10.5) (*B*). They were preincubated for 60 min with 150 pmol toxin/mg membrane protein and injected into cuvettes containing a solution identical to that with which they were loaded (*open bars*) or 150 mM of either TMAcI (*A,B*) or NMDGcI (*C*) and 10 mM of either HEPES/TMAOH (pH 7.5) or CAPS/TMAOH (pH 10.5) (*hatched bars*). Means labeled with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Fig. 5. Effects of *B. thuringiensis* toxins on the membrane potential generated by a K^+ gradient in the presence of valinomycin. Membrane vesicles loaded with 150 mM KCl and 10 mM of either HEPES/TMAOH (pH 7.5) (*A*) or CAPS/TMAOH (pH 10.5) (*B*) were preincubated for 60 minutes with the indicated concentrations of Cry1Aa (●), Cry1Ab (■), Cry1Ac (▲), Cry1B (◆), Cry1C (★) or Cry1E (▼). They were injected into cuvettes containing 150 mM TMAcI, 7.5 μ M valinomycin and 10 mM of either HEPES/TMAOH (pH 7.5) (*A*) or CAPS/TMAOH (pH 10.5) (*B*). Relative fluorescence levels measured in the absence of a membrane potential were 0.88 ± 0.01 at pH 7.5 (*A*) and 0.73 ± 0.01 at pH 10.5 (*B*).

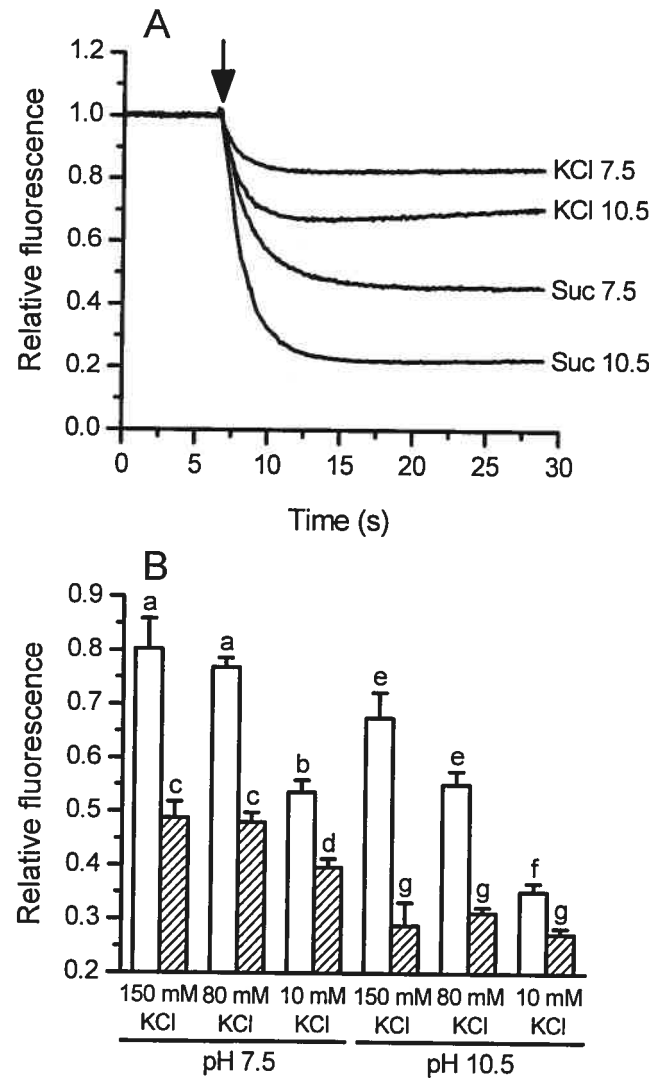
Figure 1

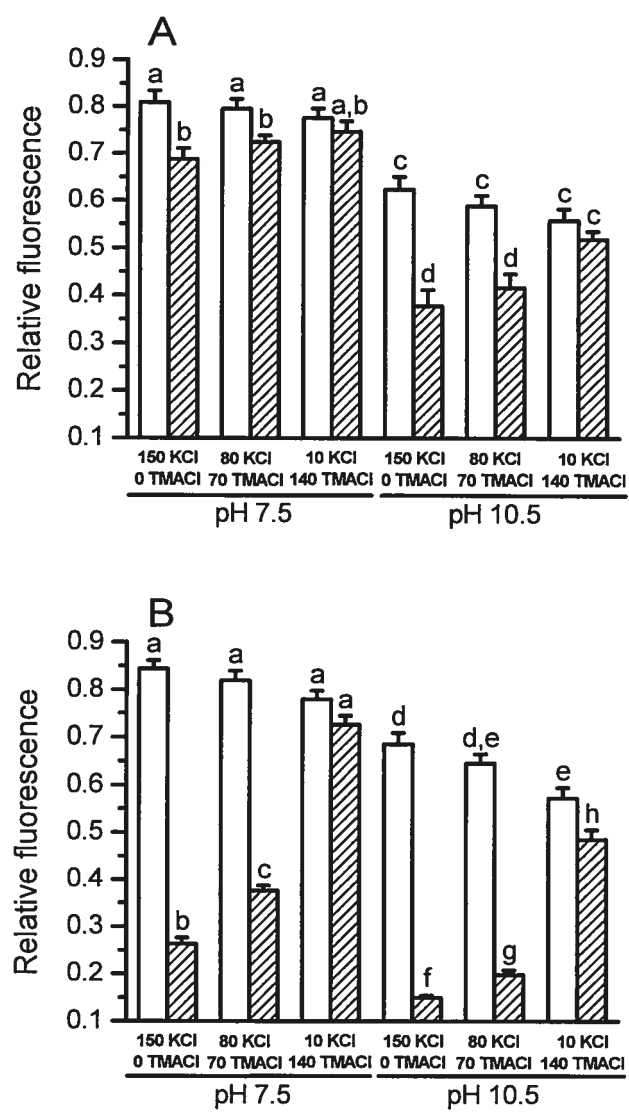
Figure 2

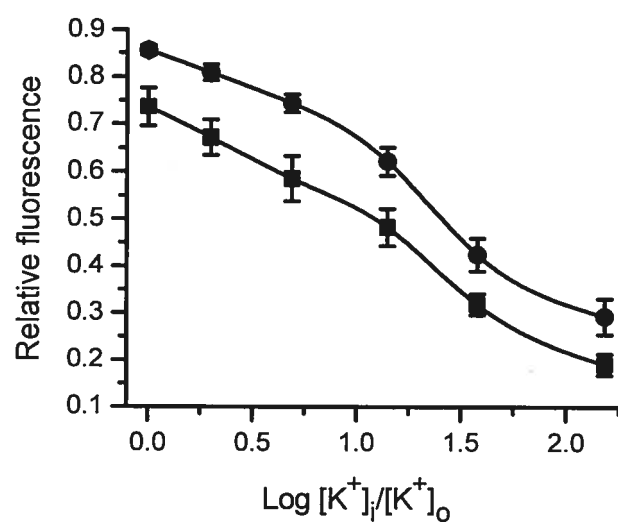
Figure 3

Figure 4

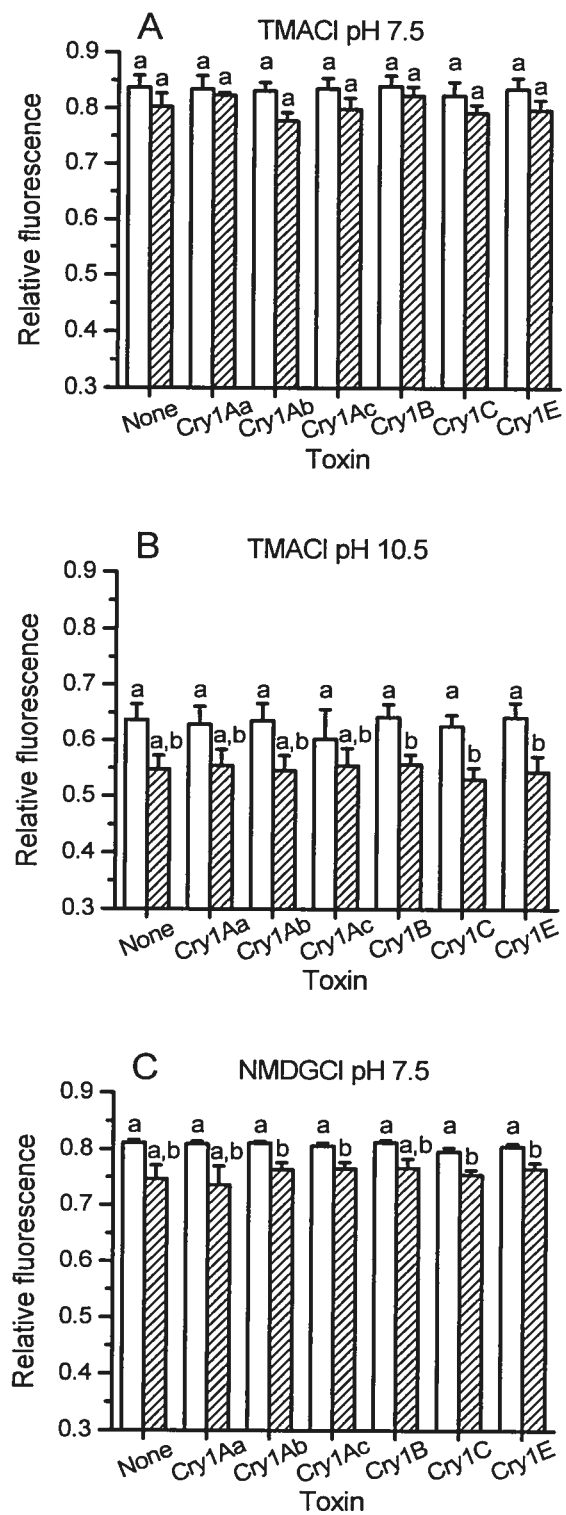
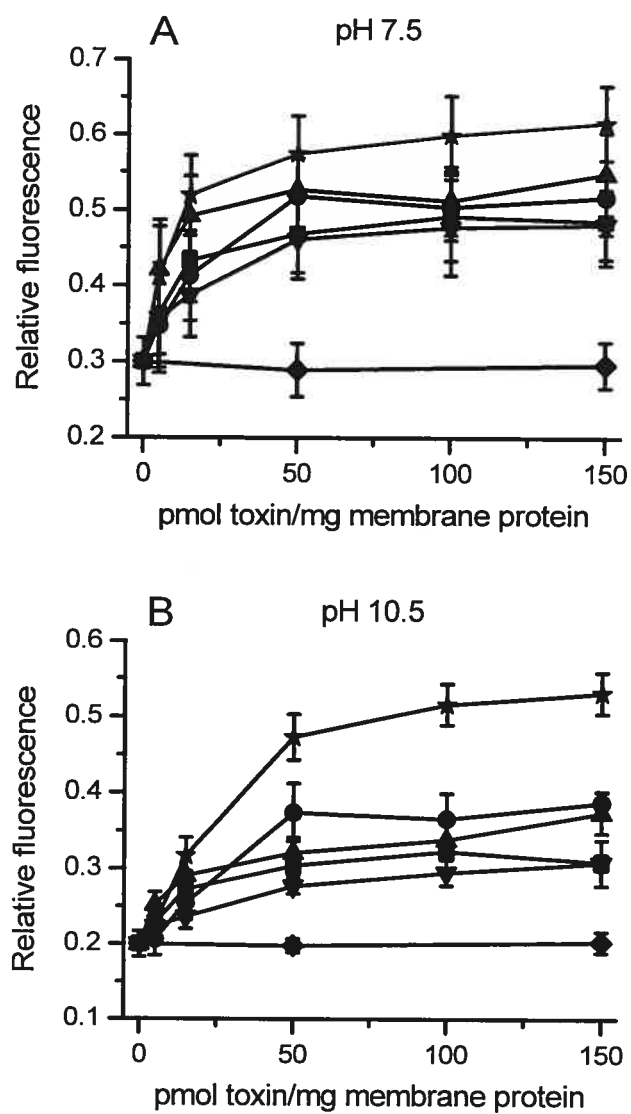


Figure 5

Accord des coauteurs**Identification de l'étudiant**

Martin Kirouac

Ph.D. physique – biophysique et physiologie moléculaire

Description de l'article

Titre : Analysis of the Properties of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxins Using a Potential-sensitive Fluorescent Probe

Auteurs : Martin Kirouac, Vincent Vachon, Sébastien Rivest, Jean-Louis Schwartz, Raynald Laprade

Revue : Journal of Membrane Biology, novembre 2003, vol. 196, no. 1, pp. 51–59.

Déclaration des coauteurs

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Martin Kirouac inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Effets des toxines insecticides du bacille de Thuringe sur la perméabilité des vésicules de membrane à bordure en brosse intestinale du sphinx du tabac ».

Vincent Vachon :

Date : 21 juin 2006

Sébastien Rivest :

Date : 5/6/6

Jean-Louis Schwartz :

Date : 21/06/2006

Raynald Laprade :

Date : 20/06/2006

Rosita Sturm (Ms.)
Springer
Rights & Permissions

CHAPITRE 5

PROTEASE INHIBITORS FAIL TO PREVENT PORE FORMATION BY THE ACTIVATED *BACILLUS THURINGIENSIS* TOXIN CRY1AA IN INSECT BRUSH BORDER MEMBRANE VESICLES

Martin Kirouac, Vincent Vachon, Delphine Quievy, Jean-Louis Schwartz
et Raynald Laprade

Applied and Environmental Microbiology 72 (2006) 506–515

RÉSUMÉ

Afin d'évaluer la possibilité que les protéases membranaires puissent jouer un rôle dans l'activité des toxines insecticides de *Bacillus thuringiensis*, la vitesse de formation de pores par la Cry1Aa activée par la trypsine a été étudiée en présence d'une variété d'inhibiteurs de protéases avec des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées de l'intestin moyen de *Manduca sexta* et une technique de gonflement osmotique basée sur des mesures de lumière diffusée. La majorité des inhibiteurs n'ont pas d'effet sur la capacité de la toxine à former des pores. Cependant, le fluorure de phénylméthylsulfonyl, un inhibiteur de protéases à sérine, favorise la formation des pores, mais à des concentrations plus élevées que celles qui sont généralement utilisées pour inhiber les protéases. Parmi les inhibiteurs de métalloprotéases utilisés, l'*o*-phénanthroline n'a pas d'effet significatif ; l'EDTA et l'EGTA réduisent la vitesse de formation de pores à pH 10.5, mais seulement l'EDTA a un effet inhibiteur à pH 7.5. Ces deux chélateurs n'influencent pas les propriétés des pores préalablement formés lors d'une incubation des vésicules avec la toxine. Ces résultats montrent qu'une fois activée, la Cry1Aa est complètement fonctionnelle et ne requiert pas de protéolyse supplémentaire. L'effet de l'EDTA et de l'EGTA est probablement mieux expliqué par leur capacité à chélater les cations divalents qui peuvent être nécessaires pour la stabilité des récepteurs de la toxine ou intervenir dans l'une ou l'autre des étapes du mécanisme de formation des pores.

Protease Inhibitors Fail to Prevent Pore Formation by the Activated
Bacillus thuringiensis Toxin Cry1Aa in Insect Brush Border
Membrane Vesicles

Martin Kirouac, Vincent Vachon, Delphine Quievy, Jean-Louis Schwartz, and Raynald
Laprade*

*Groupe d'Étude des Protéines Membranaires, Université de Montréal,
Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada, and Biocontrol Network, Canada*

Received 19 August 2005/Accepted 18 October 2005

Running title: Protease Inhibitors Fail to Prevent Pore Formation

Applied and Environmental Microbiology 72 (2006) 506–515.

© American Society for Microbiology 2006

* Corresponding author. Mailing address: Groupe d'Étude des Protéines
Membranaires, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Centre Ville Station, Montreal,
Quebec, H3C 3J7, Canada. Phone: (514) 343-7960. Fax: (514) 343-7146. E-mail:

[REDACTED]

To investigate whether membrane proteases are involved in the activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins, the rate of pore formation by trypsin-activated Cry1Aa was monitored in the presence of a variety of protease inhibitors with *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles and a light-scattering assay. Most of the inhibitors tested had no effect on the pore-forming ability of the toxin. However, phenylmethylsulfonyl fluoride, a serine protease inhibitor, promoted pore formation, although this stimulation only occurred at higher inhibitor concentrations than those commonly used to inhibit proteases. Among the metalloprotease inhibitors, *o*-phenanthroline had no significant effect; EDTA and EGTA reduced the rate of pore formation at pH 10.5, but only EDTA was inhibitory at pH 7.5. Neither chelator affected the properties of the pores already formed after incubation of the vesicles with the toxin. Taken together, these results indicate that, once activated, Cry1Aa is completely functional and does not require further proteolysis. The effect of EDTA and EGTA is probably better explained by their ability to chelate divalent cations that could be necessary for the stability of the toxin's receptors or involved elsewhere in the mechanism of pore formation.

Bacillus thuringiensis is by far the most widely used alternative to chemical insecticides for the control of insect pests in forestry, agriculture and public health. During sporulation, this bacterium produces insecticidal proteins that accumulate in the form of parasporal crystals. Following their ingestion by susceptible insect larvae, these protoxins are solubilized and converted to active toxins by midgut proteases. Activated toxins act by forming pores after binding to specific receptors at the surface of the insect midgut luminal membrane, leading to cell lysis, destruction of the epithelium, and death of the insect (52). In their activated form, all *B. thuringiensis* Cry toxins for which the crystal structure has been solved share a similar three-domain structure (7, 21, 24, 33, 34, 44). Domain I is composed of a bundle of seven anti-parallel α -helices and is generally thought to be responsible for membrane insertion and pore formation, while domains II and III are mainly composed of β -sheets and involved in the binding, specificity, and stability of the toxin (24, 33, 52).

Midgut proteases play an essential role in the activation of *B. thuringiensis* toxins (1, 6, 13). In the case of Cry1A toxins, the first 28 amino acid residues are removed from the N terminus and approximately half of the protoxin residues are removed from the C terminus (6). However, susceptibility of the activated toxins to further proteolysis in the midgut environment could possibly affect toxicity and explain apparent discrepancies that are occasionally observed between their in vitro and in vivo activities (15, 41, 49, 60). For example, Cry1Ca can be completely degraded when incubated with midgut juice from advanced larval instars of *Spodoptera littoralis* (29). Synergistic effects between *B. thuringiensis* toxins and protease inhibitors have been reported (39, 55), suggesting that some degradation of activated toxins occurs in the midgut (47, 55). Such degradation could be triggered by receptor binding (55).

Several in vitro studies have identified proteolytic cleavage sites within the activated toxin. These are found at the C-terminal end of helix $\alpha 1$ of Cry1Ac (46); between $\alpha 1$ and $\alpha 2a$ of Cry1Ab (23) and Cry1Ac (35); within $\alpha 2a$ of Cry1Ab (43) and Cry1Ac (35); between $\alpha 2a$ and $\alpha 2b$ of Cry1Ab (43) and Cry1Ac (35, 46); between $\alpha 2$ and $\alpha 3$ of Cry4Ba (7); between $\alpha 3$ and $\alpha 4$ of Cry2Aa (3, 45), Cry3Aa (10, 12), and Cry9Ca (32); between $\alpha 5$ and $\alpha 6$ of Cry4Aa (66), Cry4Ba (2, 68) and Cry9Aa (68); between $\beta 4$ - and

β 5-sheets of Cry11Aa (17, 67); between β 6 and β 7r of Cry1Aa (48); within β 7r of Cry1Ab (14); and between β 9 and β 10 of Cry1Ac (35). The functional significance of these cleavages remains unclear. Removal of helices α 1 and α 2 during the crystallization of Cry4Ba did not affect its mosquito larvicidal activity compared with that of freshly activated Cry4Ba, which aligns with the N terminus of α 1 in homologous toxins (7). This result suggests that cleavage within the activated toxin does not necessarily lead to a significant alteration of its insecticidal activity. In contrast, midgut enzymatic activity appears to play an important role in the mode of action of Cry3Aa, since proteolytic removal of the C-terminal end of domain III allowed the toxin to become soluble under the midgut pH conditions found in susceptible larvae (10).

Recent studies suggest that activated toxins could be further processed by midgut proteases after binding to their membrane receptors. Lightwood et al. (35) suggested that a cleavage within domain I of Cry1Ac could facilitate membrane insertion without necessarily be required for pore formation. According to Gómez et al. (23), binding of Cry1Ab to the cadherin-like receptor BT-R₁ allows the proteolytic cleavage of helix α 1 in domain I of the toxin, resulting in the formation of a tetrameric pre-pore structure. They proposed that this cleavage could be essential for pore formation. The fact that activated toxins form pores in isolated brush border membrane vesicles in the absence of soluble midgut proteases suggests that membrane proteases could be involved in the mechanism of action of these toxins. In agreement with this suggestion, *Culex quinquefasciatus* brush border membrane proteases have been reported to cleave the Cry11Aa toxin (17). To investigate the possibility that membrane-associated proteases are involved in toxin function, the effect of a variety of membrane protease inhibitors on the pore-forming activity of the trypsin-activated toxin Cry1Aa was studied. Pore formation was monitored in vitro with *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles and an osmotic swelling assay (11). The results indicate that trypsin-activated Cry1Aa is completely functional.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), antipain, aprotinin, bestatin, EGTA, leupeptin, *o*-phenanthroline, 4-chloromercuribenzoic acid (pCMB),

pepstatin A, *p*-hydroxymercuribenzoate, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64), *N*-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), and *N*-*p*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) were purchased from Sigma (St. Louis, Mo). EDTA was from Fisher Scientific (Nepean, Ontario). Protease inhibitors were solubilized in water except pepstatin A (stock solution of 29.2 mM in dimethyl sulfoxide), pCMB (67 mM in dimethyl sulfoxide), PMSF (200 mM in ethanol) and *o*-phenanthroline (200 mM in methanol). A cocktail (Protease Inhibitor Cocktail Set III) containing 100 mM AEBSF, 80 μ M aprotinin, 5 mM bestatin, 1.5 mM E-64, 2 mM leupeptin and 1 mM pepstatin A solubilized in dimethyl sulfoxide was purchased from Calbiochem (San Diego, CA) and used at a final 100-fold dilution.

Preparation of membrane vesicles. Whole midguts were isolated from fifth-instar *M. sexta* larvae (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC); freed of attached Malpighian tubules and luminal contents; rinsed thoroughly with ice-cold 300 mM sucrose, 17 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 5 mM EGTA; and stored at -80°C until use. Brush border membrane vesicles were prepared by magnesium precipitation and a differential centrifugation technique (64). The final membrane preparation was resuspended in 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) and stored at -80°C until use.

Toxins. *B. thuringiensis* strains HD73Cry⁻ and HD1Cry⁻B and *Escherichia coli* strains HB101 and DH5 α were transformed, respectively, with pBA1 (4), p60.5G31 (62), pMP30 (42), and pEM14 (61) to produce Cry1Aa, Cry1Ca, Cry1Ab and Cry1Ea protoxins. Cry1Ac protoxin was produced from *B. thuringiensis* strain HD73. Protoxins were solubilized, trypsin activated, and purified by fast protein liquid chromatography as described previously (41, 42). N-terminal sequencing of Cry1Aa was performed by automated N-terminal Edman degradation at the Eastern Quebec Proteomic Center, Centre Hospitalier de l'Université Laval Research Center, Quebec, Canada.

Light-scattering assay. The permeabilizing effect of *B. thuringiensis* toxins was analyzed using an osmotic swelling technique based on light-scattering measurements

(11). Unless specified otherwise, in preparation for the experiments, vesicles were resuspended to about 90% of the desired final volume in 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) or 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid (CAPS)-KOH (pH 10.5) and allowed to equilibrate overnight at 4°C. Before the start of the experiments, they were diluted to a final concentration of 0.4 mg of membrane protein/ml with the appropriate buffer and enough bovine serum albumin to achieve a final concentration of 1 mg/ml. In kinetics experiments designed to monitor toxin-induced increases in membrane permeability to KCl, vesicles were first warmed up to 23°C and then rapidly mixed with a stopped-flow apparatus (Hi-Tech Scientific Co., Salisbury, United Kingdom) with an equal volume of a solution containing 150 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5), or CAPS-KOH (pH 10.5); 1-mg/ml bovine serum albumin; and a specified toxin concentration. Due to the hypertonic shock, water exits from the vesicles and their volume decreases rapidly. Then, depending on their permeability to KCl, vesicles reswell and subsequently recover some of their original volume. When protease inhibitors were used, they were added at least 10 min before the beginning of the experiments to the vesicle suspension and to the KCl solution. Since a high pH is present in the lepidopteran midgut (18, 19), most experiments were carried out at pH 10.5.

Alternatively, for incubation experiments, vesicles were incubated with the indicated concentration of toxin for 60 min at 23°C and then mixed with a solution containing 150 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5), or CAPS-KOH (pH 10.5) and 1-mg/ml bovine serum albumin. In these experiments, protease inhibitors were added to the vesicle suspension and the KCl solution 10 min before the addition of the toxin or after an incubation period of 50 min with the toxin.

Scattered light intensity was monitored at a wavelength of 450 nm at a frequency of 10 Hz with a PTI spectrofluorometer (Photon Technology International, South Brunswick, NJ) with a photomultiplier tube located at 90° from the incident light beam.

Data analysis. As described previously (59), scattered light measurements were first converted into relative scattered light intensity where the value of 1 was attributed to the highest intensity measured in the absence of toxin and the value 0 was attributed to the lowest intensity measured with 150 pmol Cry1Aa/mg of membrane protein. Percent

volume recovery was defined as $100(1-I_t)$ where I_t is the relative scattered light intensity measured at a given time (t). For pore formation kinetics experiments, percent volume recovery was calculated for every experimental point. Values obtained with control vesicles, assayed without toxin, were subtracted from the experimental values measured in the presence of toxin. To take into account any influence of the inhibitors and their solvents on scattered light intensity measurements, these compounds were also added in the control experiments performed without toxin. Volume recovery curves were then fitted with a Boltzmann sigmoid with the software Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA). The osmotic swelling rate was taken as the maximum slope of these curves.

Data are means \pm standard error of the mean (SEM) of at least three experiments, each performed with a different vesicle preparation. Experimental values for each individual experiment consisted of the average of five replicates obtained using the same vesicle preparation. Statistical comparisons were made with the two-tailed unpaired t test.

RESULTS

Effect of various protease inhibitors on the pore-forming activity of Cry1Aa.

Midgut brush border membrane vesicles were rapidly mixed with an equal volume of 150 mM KCl. Following the osmotic shock, the vesicles reswelled at a rate that increased with toxin concentration (Fig. 1). To test the possible role of membrane proteases in the mode of action of *B. thuringiensis* toxins, the effect of a variety of protease inhibitors on the pore-forming activity of Cry1Aa was tested (Fig. 2 and Table 1). Protease inhibitors were used at a concentration known to be largely sufficient to inhibit the type of protease against which they are active (5, 51, 58, 65). Because in theory protease inhibitors could either stimulate or inhibit pore formation, a toxin concentration of 50 pmol toxin/mg of membrane protein was chosen to test all inhibitors.

PMSF significantly promoted membrane permeabilization by Cry1Aa (Fig. 2A), while EDTA clearly abolished this permeabilization (Fig. 2B). Although the effect of PMSF suggests that a membrane protease could inhibit pore formation, all other serine

protease inhibitors tested (AEBSF, TLCK, TPCK, aprotinin, leupeptin and antipain) were ineffective (Table 1). The efficacy of TLCK and TPCK is maximal around neutral pH values and decreased rapidly under alkaline conditions (53, 56). The effect of these two inhibitors on Cry1Aa pore formation was therefore also tested at pH 7.5. At this pH, the osmotic swelling rates were $96\% \pm 4\%$ (based on the results of three experiments) and $99\% \pm 8\%$ (three experiments) control activity in the presence of TLCK and TPCK, respectively, thus confirming that these two inhibitors had no effect on the pore-forming activity of the toxin.

Like EDTA, EGTA also inhibited Cry1Aa activity, but *o*-phenanthroline had no effect (Table 1). Both zinc-dependent metalloproteases and some calcium-stabilized proteases from other classes could be inactivated by the first two chelating agents. *o*-Phenanthroline is usually preferred as an inhibitor of metalloproteases, since it has a much higher stability constant for zinc than for calcium (51). Considering the fact that the solubility of most divalent cations is very low at pH 10.5, EDTA and EGTA were also tested at pH 7.5. At this pH, EDTA inhibited pore formation ($16.5\% \pm 0.1\%$ of control activity; three experiments; $P = 0.003$), but EGTA had no effect ($105\% \pm 8\%$ of control activity; three experiments; $P = 0.7$). The lack of effect of EGTA at pH 7.5 and of *o*-phenanthroline clearly indicates that a metalloprotease is not essential for pore formation.

Among the cysteine protease inhibitors tested (E-64, pCMB, and *p*-hydroxymercuribenzoate) only pCMB reduced significantly, although slightly, the activity of Cry1Aa (Table 1). The aspartate protease inhibitors tested (antipain and pepstatin A) and an aminopeptidase inhibitor (bestatin) had no significant effect (Table 1). Since several types of membrane proteases could potentially act at the same time, a cocktail that inhibits aminopeptidases, as well as serine, cysteine, and aspartate proteases, was also tested. However, it had no effect on the activity of Cry1Aa (Table 1). Furthermore, to ensure that the apparent lack of activity of membrane proteases on the pore-forming ability of Cry1Aa did not result from the use of a Cry1Aa preparation that was already cleaved within domain I, the N-terminal end was sequenced. It corresponds exactly to the beginning of the activated toxin ($^{29}\text{IETGY}^{33}$).

Effect of PMSF on the pore-forming activity of Cry1 toxins. PMSF significantly enhanced the rate of osmotic swelling induced by Cry1Aa, with a maximum effect reached at about 4 mM (Fig. 3). Osmotic swelling rates increased more rapidly as a function of toxin concentration in the presence of PMSF than in its absence (Fig. 4). Nevertheless, swelling rates never reached a constant value indicative of receptor saturation for toxin concentrations up to 600 pmol/mg of membrane protein. PMSF also promoted membrane permeabilization by Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, and Cry1Ea (Table 2). Since Cry1Ca causes a much smaller osmotic swelling rate at pH 10.5 than the other toxins tested (59), experiments with this toxin were performed with a higher toxin concentration (150 pmol/mg of membrane protein). The stimulatory effect of PMSF on the pore-forming activity of Cry1Aa, Cry1Ac, and Cry1Ca was similar. However, this effect was significantly ($P < 0.05$) stronger for Cry1Ea and weaker for Cry1Ab than for Cry1Aa.

To investigate whether PMSF acts on the toxin molecule or on the vesicles, toxin and vesicles concentrated 30 and 10 fold, respectively, were incubated overnight with 4 mM PMSF (Table 3). The toxin and vesicles were then diluted to their usual final concentration immediately before the onset of the osmotic swelling experiments. This dilution and the short half-life of PMSF in water (about 1 h) (28) ensure that the active concentration of PMSF becomes negligible during the osmotic swelling part of the experiment. Overnight incubation of vesicles, toxin, or both with PMSF or ethanol (the solvent in which PMSF was solubilized) had no significant effect on the activity of the toxin (Table 3). According to these results, the effect of PMSF could have been due to a modification of the toxin molecule on a serine residue (22) that was only accessible after binding of the toxin to its receptor. The effect of PMSF (Fig. 3) could also be due to a modification of pore properties. To test this hypothesis, vesicles were incubated for 60 min with or without 50 pmol of toxin/mg of membrane protein. PMSF was added to the vesicle suspension and to the KCl solution 10 min before the addition of the toxin or for 10 min at the end of the incubation period (Fig. 5). PMSF had no effect on the control experiments performed without toxin and no effect on the Cry1Aa-induced permeability, whether it was added at the beginning or at the end of the incubation period. Previous results show that during incubation experiments performed in the absence of PMSF,

volume recovery induced by Cry1Aa reaches a constant value between 50 to 100 pmol of toxin/mg of membrane protein (60). However, the lack of activity of PMSF does not appear to be due to the use of a saturating toxin concentration, since experiments performed with a lower toxin concentration (15 pmol of toxin/mg of membrane protein) yielded similar results (data not shown).

Effect of EDTA and EGTA on the pore-forming activity of Cry1 toxins. The rate of pore formation by Cry1Aa was first examined at pH 10.5 in the presence of various concentrations of EDTA and EGTA (Fig. 6A and B). Since EGTA did not inhibit pore formation by Cry1Aa at pH 7.5, as mentioned above, a dose-response experiment was only performed for EDTA at this pH (Fig. 6C). At pH 10.5, the inhibition curve was much steeper for EDTA (Fig. 6A) than for EGTA (Fig. 6B); for EDTA, the curve was much steeper at pH 10.5 (Fig. 6A) than at pH 7.5 (Fig. 6C).

The addition of an excess of divalent cations after a 10-min incubation of the vesicles with EDTA was used to test the reversibility of the inhibitory effect of EDTA (Table 4). Based on the dose-response curves of Fig. 6, vesicles and toxin were first incubated for 10 min with 0.4 mM EDTA at pH 7.5 or with 0.2 mM EDTA at pH 10.5. Then, 2 mM CaCl_2 , MgCl_2 , or BaCl_2 (pH 7.5) or 1 mM CaCl_2 (pH 10.5) was added before the osmotic swelling experiment. Because Mg^{2+} and Ba^{2+} form insoluble hydroxides at high pH, MgCl_2 and BaCl_2 were only tested at pH 7.5. At both pH values, addition of divalent cations reversed the inhibition of Cry1Aa pore-forming activity by EDTA (Table 4). However, the addition of 2 mM CaCl_2 at pH 7.5 significantly reduced the pore-forming activity of the toxin by approximately 25% in both the presence and absence of EDTA.

The effect of EDTA was also tested on other Cry1 toxins at pH 10.5. At 2 mM, EDTA inhibited pore formation by Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ea but had no effect on the activity of Cry1Ca (Table 5). The effect of EDTA and EGTA could be due to an inhibition of pore formation or to a modification of the properties of the pores. To distinguish between these two possibilities, incubation experiments were performed with EDTA (Fig. 7A and B) and EGTA (Fig. 7C and D). Vesicles were incubated for 60 min with or without 50 pmol toxin/mg of membrane protein. EDTA or EGTA was added to the vesicle suspension and the KCl solution 10 min before the toxin or for 10 min at the

end of the incubation period. These experiments were carried out at pH 7.5 (Fig. 7A and C) and pH 10.5 (Fig. 7B and D). At pH 7.5, neither EDTA (Fig. 7A) nor EGTA (Fig. 7C) affected membrane permeability in the presence or absence of toxin when added at the beginning or at the end of the incubation period. At pH 10.5, EDTA (Fig. 7B) reduced membrane permeabilization by Cry1Aa, but EGTA (Fig. 7D) had no detectable effect. The effect of EDTA was considerably more pronounced when added at the beginning of the incubation period.

DISCUSSION

To test the hypothesis that membrane proteases could play a role in the mode of action of *B. thuringiensis* toxins, the effect of a variety of protease inhibitors on the pore-forming activity of Cry1Aa was tested in brush border membrane vesicles. In this assay, the only proteases present are those located at the surface of the vesicles. Commonly used inhibitors of each class of proteases were chosen. Since the principal proteases found in the lepidopteran midgut are serine proteases, mainly trypsins and chymotrypsins (58), almost half of the inhibitors tested were active against this type of proteases. PMSF promoted Cry1Aa pore formation in the kinetic experiments, but the other six serine protease inhibitors tested, including AEBSF, another sulfonyl fluoride inhibitor, were ineffective. Thus, PMSF clearly increased the rate of pore formation, but this does not appear to be due to the inhibition of a membrane protease that could inhibit pore formation by degrading toxin molecules. This interpretation is further supported by the fact that stimulation of toxin activity requires substantially higher concentrations of PMSF than commonly used to inhibit proteases. Unfortunately, AEBSF could not be used at concentrations at which PMSF was stimulatory (3 to 5 mM) because under these conditions the solutions became turbid in the stopped-flow apparatus. Apparently, this was caused by an interaction of AEBSF with the silicone grease used to lubricate the syringes. Synergistic effects between *B. thuringiensis* toxins and serine protease inhibitors have nevertheless been documented (39, 55). For instance, MacIntosh et al. (39) reported that micromolar amounts of the soybean serine protease inhibitors Bowman-Birk and Kunitz potentiate (2 to 40 fold) the insecticidal activity of *B. thuringiensis* toxins against *Heliothis virescens*, *Heliothis zea*, *Leptinotarsa*

decemlineata, *M. sexta*, and *Trichoplusia ni*; it was suggested that such enhancement could be partly the result of reduced toxin degradation when midgut juice proteases are inhibited (47). However, Tabashnik et al. (57) found that these two inhibitors failed to synergize toxin activity in *Plutella xylostella*.

The lack of effect of PMSF, when added at the beginning or at the end of the incubation experiments, shows that PMSF does not change the maximum number of pores that can be formed in the vesicles and does not alter the biophysical properties of the pores. Furthermore, pretreatment of the vesicles and toxin molecules with PMSF does not increase the rate of pore formation in the kinetic experiments, suggesting that PMSF acts specifically during the process of pore formation. The effect of PMSF could possibly be explained by a modification of the toxin molecule on a serine residue (22) that only becomes accessible after binding of the toxin to the receptor. This modification could enhance toxin activity by adding one or several hydrophobic groups on the toxin molecule that could accelerate toxin insertion into the membrane. PMSF not only stimulated Cry1Aa but also enhanced the rate of pore formation by Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, and Cry1Ea. However, the fact that PMSF promotes pore formation only when added simultaneously with the toxin and vesicles complicates its potential use to enhance the activity of commercial *B. thuringiensis*-based products, since PMSF could also inhibit midgut proteases that are essential for toxin activation. Furthermore, PMSF is relatively toxic and not very stable in water (28, 51).

EDTA and EGTA reduced the rate of pore formation by Cry1Aa at pH 10.5, but only EDTA was inhibitory at pH 7.5. EDTA and EGTA did not prevent pore formation during a long (60-min) incubation period with the toxin and did not affect the properties of the pores already formed. At pH 10.5, the rate of pore formation by Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ea was also reduced by EDTA, but this chelator did not affect that of Cry1Ca. Since under certain conditions, pore formation was not affected by divalent cation chelators, the effect of EDTA and EGTA on toxin activity does not correlate with the inhibition of a proteolytic activity that would be essential for toxin activity. This conclusion is supported by the lack of effect of *o*-phenanthroline, which has a much higher stability constant for heavy metal ions (essential cofactors for the activity of metalloproteases) than for calcium (51). Furthermore, the effect of EDTA and EGTA

can be reversed in a nonspecific way by the addition of an excess of calcium, magnesium, or barium. In contrast with earlier suggestions (16, 38) but in agreement with other experiments using brush border membrane vesicles (25, 30, 63), calcium and barium do not block the pores formed by the toxin. The slight reduction in the activity of Cry1Aa observed in the presence of 2 mM CaCl_2 at pH 7.5 can be explained by an effect of the increased ionic strength of the KCl solution (M. Fortier, V. Vachon, M. Kirouac, J.-L. Schwartz, and R. Laprade, submitted for publication).

The best-characterized receptors for Cry1Aa and other *B. thuringiensis* Cry toxins are aminopeptidase N and cadherin-like proteins (52). EDTA and EGTA could possibly influence the enzymatic activity or the stability of these receptors. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* (27), for example, is a zinc enzyme that is well inhibited by *o*-phenanthroline and bestatin but poorly inhibited by EDTA. In the present study, the pore-forming activity of Cry1Aa was not affected by *o*-phenanthroline or bestatin, indicating that the role of aminopeptidase N as a toxin receptor is independent of its enzymatic activity. This conclusion was already suggested by Lorence et al. (37), although the reliability of the fluorometric assay that was used to monitor pore formation (37) has been questioned (31). However, it is in contradiction with the interpretation recently formulated by Hossain et al. (26) according to whom the activity of aminopeptidase N can modify the N terminus of Cry toxins to expose a recognition site for receptor binding. On the other hand, chelation of calcium by EDTA and EGTA favors cleavage of the cadherin-like toxin receptor BT-R₁ (9, 40). However, the major degradation products appear to retain full capacity to bind Cry1Ab in ligand blot experiments, even after prolonged (24-h) incubation (9, 40). It is nevertheless not clear whether binding of the toxin to a partially degraded receptor leads to pore formation. Calcium-dependent structural integrity of the cadherins does not appear to be important for toxin activity, since EGTA had no effect at pH 7.5 and Cry1Aa always formed pores following a 60-min incubation in the presence of either Ca^{2+} chelator.

Cultured High Five insect cells have recently been shown to become susceptible to Cry1Ab when expressing the cadherin receptor BT-R₁ (69). Interestingly, Cry1Ab toxicity was abolished by EDTA, but not by EGTA. Based on this observation and the fact that EGTA chelates Ca^{2+} much better than Mg^{2+} , it was suggested that toxicity could

involve the activation of an Mg^{2+} -dependent intracellular signaling pathway (69). The inhibition by EDTA of pore formation observed in the present study, however, contradicts this hypothesis, since signaling pathways clearly cannot be operational in isolated brush border membrane vesicles. The observation that EGTA had a detectable effect on toxin activity in osmotic swelling experiments but was ineffective in experiments performed with cultured cells is consistent with the use of a higher pH in the former experiments and the fact that EGTA chelates Mg^{2+} more efficiently as pH is increased (54). The effects of EDTA and EGTA could therefore be better explained by the chelation of divalent cations involved elsewhere in the mechanism of pore formation, at the level of the membrane, such as the oligomerization of toxin molecules. It should be pointed out that the observation that EDTA is more strongly inhibitory than EGTA does not necessarily imply that Mg^{2+} is required for pore formation. The possibility that EDTA inhibits toxin activity because of its ability to chelate efficiently most divalent cations cannot be excluded. The observed effects of EDTA and EGTA nevertheless contrast with bioassays, demonstrating a synergistic effect of *B. thuringiensis* toxins and EDTA, which reduces 50% lethal concentrations of *B. thuringiensis* toxins by 5 fold against *P. xylostella* (36), 10 fold against *Agrotis ipsilon* (50), and 100 fold against *Plodia interpunctella* (20). The mechanism by which these chelators enhance toxicity thus appears to differ from a simple depletion of divalent cations in the midguts of the larvae.

The effect of PMSF, EDTA, and EGTA does not correlate with the inhibition of the activity of a membrane protease; all the other protease inhibitors tested had little effect on pore formation by Cry1Aa. Thus, in contrast with earlier suggestions based on experiments carried out with Cry1Ab (8, 23), a cleavage in domain I by membrane proteases does not appear to be a necessary step in the mode of action of *B. thuringiensis* toxins. Nevertheless, we cannot exclude that brush border membrane vesicles contain a membrane protease that could not be inhibited by any of the compounds used in this study and that this unusual protease plays a critical role in the activity of the toxin. It also remains possible that a proteolytic cleavage within domain I of the receptor-bound toxin stimulates pore formation (35). However, brush border membrane proteases do not appear to be sufficient to allow such a cleavage, at least after vesicles are prepared. The

possible involvement of soluble proteases from the insect midgut remains to be studied. Since we have observed that brush border membrane vesicles are destabilized by midgut juice, another experimental system will be required to address this question. Preliminary results indicate that this can be achieved by the electrophysiological technique developed in our laboratory (49).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor Dominique Michaud, Université Laval, Quebec, Canada, for his help in preparing toxin samples for sequencing.

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT), and Valorisation-Recherche Québec. M. Kirouac received a graduate scholarship from the FQRNT.

REFERENCES

1. **Andrews, R. E., Jr., M. M. Bibilos, and L. A. Bulla, Jr.** 1985. Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Appl. Environ. Microbiol. **50**:737–742.
2. **Angsuthanasombat, C., N. Crickmore, and D. J. Ellar.** 1993. Effects on toxicity of eliminating a cleavage site in a predicted interhelical loop in *Bacillus thuringiensis* CryIVB δ -endotoxin. FEMS Microbiol. Lett. **111**:255–262.
3. **Audtho, M., A. P. Valaitis, O. Alzate, and D. H. Dean.** 1999. Production of chymotrypsin-resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1 δ -endotoxin by protein engineering. Appl. Environ. Microbiol. **65**:4601–4605.
4. **Bah, A., K. van Frankenhuyzen, R. Brousseau, and L. Masson.** 2004. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. J. Invertebr. Pathol. **85**:120–127.
5. **Barrett, A. J.** 1994. Classification of peptidases. Methods Enzymol. **244**:1–15.
6. **Bietlot, H., P. R. Carey, C. Choma, H. Kaplan, T. Lessard, and M. Pozsgay.** 1989. Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Biochem. J. **260**:87–91.
7. **Boonserm, P., P. Davis, D. J. Ellar, and J. Li.** 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. J. Mol. Biol. **348**:363–382.
8. **Bravo, A., I. Gómez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. S. Gill, and M. Soberón.** 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochim. Biophys. Acta **1667**:38–46.
9. **Candas, M., B. R. Francis, N. B. Griko, E. G. Midboe, and L. A. Bulla, Jr.** 2002. Proteolytic cleavage of the developmentally important cadherin BT-R₁ in the midgut epithelium of *Manduca sexta*. Biochemistry **41**:13717–13724.
10. **Carroll, J., D. Convents, J. Van Damme, A. Boets, J. Van Rie, and D. J. Ellar.** 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. J. Invertebr. Pathol. **70**:41–49.

11. **Carroll, J., and D. J. Ellar.** 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* **214**:771–778.
12. **Carroll, J., J. Li, and D. J. Ellar.** 1989. Proteolytic processing of a coleopteran-specific δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochem. J.* **261**:99–105.
13. **Choma, C. T., W. K. Surewicz, P. R. Carey, M. Pozsgay, T. Raynor, and H. Kaplan.** 1990. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. *Eur. J. Biochem.* **189**:523–527.
14. **Convents, D., M. Cherlet, J. Van Damme, I. Lasters, and M. Lauwereys.** 1991. Two structural domains as a general fold of the toxic fragment of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* **195**:631–635.
15. **Coux, F., V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M. Bes, S. Rivest, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade, and R. Frutos.** 2001. Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* **276**:35546–35551.
16. **Crawford, D. N., and W. R. Harvey.** 1988. Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* **137**:277–286.
17. **Dai, S.-M., and S. S. Gill.** 1993. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**:273–283.
18. **Dow, J. A. T.** 1984. Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.* **246**:R633–R635.
19. **Dow, J. A. T.** 1992. pH gradients in lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* **172**:355–375.
20. **El-Moursy, A., R. Aboul-Ela, H. S. Salama, and A. Abdel-Razek.** 1992. Chemical additives that affect the potency of endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against *Plodia interpunctella*. *Insect Sci. Applic.* **13**:775–779.

21. **Galitsky, N., V. Cody, A. Wojteczak, D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangporn, and L. English.** 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**:1101–1109.
22. **Gold, A. M.** 1965. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. III. Identification of serine as the site of sulfonylation in phenylmethanesulfonyl α -chymotrypsin. *Biochemistry* **4**:897–901.
23. **Gómez, I., J. Sánchez, R. Miranda, A. Bravo, and M. Soberón.** 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**:242–246.
24. **Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Puztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler.** 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**:447–464.
25. **Hendrickx, K., A. De Loof, and H. Van Mellaert.** 1990. Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. *Comp. Biochem. Physiol.* **95C**:241–245.
26. **Hossain, D. M., Y. Shitomi, K. Moriyama, M. Higuchi, T. Hayakawa, T. Mitsui, R. Sato, and H. Hori.** 2004. Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4604–4612.
27. **Hua, G., K. Tsukamoto, R. Taguchi, M. Tomita, S. Miyajima, and H. Ikezawa.** 1998. Characterization of aminopeptidase N from the brush border membrane of the larvae midgut of silkworm, *Bombyx mori* as a zinc enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1383**:301–310.
28. **James, G. T.** 1978. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Anal. Biochem.* **86**:574–579.
29. **Keller, M., B. Sneh, N. Strizhov, E. Prudovsky, A. Regev, C. Koncz, J. Schell, and A. Zilberstein.** 1996. Digestion of δ -entotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**:365–373.

30. **Kirouac, M., V. Vachon, J.-F. Noël, F. Girard, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 2002. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1561**:171–179.
31. **Kirouac, M., V. Vachon, S. Rivest, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 2003. Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe. *J. Membr. Biol.* **196**:51–59.
32. **Lambert, B., L. Buysse, C. Decock, S. Jansens, C. Piens, B. Saey, J. Seurinck, K. Van Audenhove, J. Van Rie, A. Van Vliet, and M. Peferoen.** 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:80–86.
33. **Li, J., J. Carroll, and D. J. Ellar.** 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**:815–821.
34. **Li, J., D. J. Derbyshire, B. Promdonkoy, and D. J. Ellar.** 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:571–577.
35. **Lightwood, D. J., D. J. Ellar, and P. Jarrett.** 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5174–5181.
36. **Liu, Y.-B., and B. E. Tabashnik.** 1997. Synergism of *Bacillus thuringiensis* by ethylenediamine tetraacetate in susceptible and resistant larvae of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* **90**:287–292.
37. **Lorence, A., A. Darszon, and A. Bravo.** 1997. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Lett.* **414**:303–307.
38. **Lorence, A., A. Darszon, C. Díaz, A. Liévano, R. Quintero, and A. Bravo.** 1995. δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **360**:217–222.

39. **MacIntosh, S. C., G. M. Kishore, F. J. Perlak, P. G. Marrone, T. B. Stone, S. R. Sims, and R. L. Fuchs.** 1990. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* **38**:1145–1152.
40. **Martínez-Ramírez, A. C., S. González-Nebauer, B. Escriche, and M. D. Real.** 1994. Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**:782–787.
41. **Masson, L., A. Mazza, L. Gringorten, D. Baines, V. Aneliunas, and R. Brousseau.** 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* **14**:851–860.
42. **Masson, L., G. Préfontaine, L. Péloquin, P. C. K. Lau, and R. Brousseau.** 1989. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* **269**:507–512.
43. **Miranda, R., F. Z. Zamudio, and A. Bravo.** 2001. Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**:1155–1163.
44. **Morse, R. J., T. Yamamoto, and R. M. Stroud.** 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* **9**:409–417.
45. **Nichols, C. N., W. Ahmad, and D. J. Ellar.** 1989. Evidence for two different types of insecticidal P2 toxins with dual specificity in *Bacillus thuringiensis* subspecies. *J. Bacteriol.* **171**:5141–5147.
46. **Ogiwara, K., L. S. Indrasith, S. Asano, and H. Hori.** 1992. Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:121–126.
47. **Pang, A. S. D., and J. L. Gringorten.** 1998. Degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in host insect gut juice. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**:281–285.

48. **Pang, A. S. D., J. L. Gringorten, and C. Bai.** 1999. Activation and fragmentation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by high concentrations of proteolytic enzymes. *Can. J. Microbiol.* **45**:816–825.
49. **Peyronnet, O., V. Vachon, R. Brousseau, D. Baines, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1679–1684.
50. **Salama, H. S., M. S. Foda, and A. Sharaby.** 1989. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* endotoxin against the greasy cutworm *Agrotis ypsilon*. *J. Appl. Entomol.* **108**:372–380.
51. **Salvesen, G., and H. Nagase.** 1989. Inhibition of proteolytic enzymes, pp. 83–104. *In* R. J. Beynon, and J. S. Bond (ed.), *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
52. **Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775–806.
53. **Schoellmann, G., and E. Shaw.** 1963. Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. *Biochemistry* **2**:252–255.
54. **Schwarzenbach, G., and H. Flaschka.** 1969. Complexometric titrations, 2nd ed., p. 3–30. Methuen & Co., Ltd., London, United Kingdom.
55. **Shao, Z., Y. Cui, X. Liu, H. Yi, J. Ji, and Z. Yu.** 1998. Processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *J. Invertebr. Pathol.* **72**:73–81.
56. **Shaw, E., M. Mares-Guia, and W. Cohen.** 1965. Evidence for an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent, 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the chloromethyl ketone derived from N^{α} -tosyl-L-lysine. *Biochemistry* **4**:2219–2224.
57. **Tabashnik, B. E., N. Finson, and M. W. Johnson.** 1992. Two protease inhibitors fail to synergize *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* **85**:2082–2087.

58. **Terra, W. R., and C. Ferreira.** 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **109B**:1–62.
59. **Tran, L. B., V. Vachon, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 2001. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4488–4494.
60. **Vachon, V., G. Préfontaine, F. Coux, C. Rang, L. Marceau, L. Masson, R. Brousseau, R. Frutos, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 2002. Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry* **41**:6178–6184.
61. **Visser, B., E. Munsterman, A. Stoker, and W. G. Dirkse.** 1990. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *J. Bacteriol.* **172**:6783–6788.
62. **Visser, B., T. Van der Salm, W. Van den Brink, and G. Folkers.** 1988. Genes from *Bacillus thuringiensis entomocidus* 60.5 coding for insect-specific crystal proteins. *Mol. Gen. Genet.* **212**:219–224.
63. **Wolfersberger, M. G.** 1989. Neither barium nor calcium prevents the inhibition by *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin of sodium- or potassium gradient-dependent amino acid accumulation by tobacco hornworm midgut brush border membrane vesicles. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **12**:267–277.
64. **Wolfersberger, M., P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, F. V. Sacchi, B. Giordana, and G. M. Hanozet.** 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**:301–308.
65. **Wolfson, J. L., and L. L. Murdock.** 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.* **16**:1089–1102.
66. **Yamagiwa, M., M. Esaki, K. Otake, M. Inagaki, T. Komano, T. Amachi, and H. Sakai.** 1999. Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3464–3469.

67. **Yamagiwa, M., R. Ogawa, K. Yasuda, H. Natsuyama, K. Sen, and H. Sakai.** 2002. Active form of dipteran-specific insecticidal protein Cry11A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**:516–522.
68. **Zalunin, I. A., L. P. Revina, L. I. Kostina, G. G. Chestukhina, and V. M. Stepanov.** 1998. Limited proteolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIG and CryIVB δ -endotoxins leads to formation of active fragments that do not coincide with the structural domains. *J. Protein Chem.* **17**:463–471.
69. **Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, L. Rose-Young, and L. A. Bulla, Jr.** 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R₁ expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* **12**:1407–1416.

TABLE 1. Effect of protease inhibitors on the pore-forming activity of Cry1Aa

Inhibitor	Concn	Osmotic swelling rate ^a (% control activity)
PMSF	5 mM	314 ± 60 (3)*
AEBSF	1 mM	101 ± 15 (3)
TLCK	0.1 mM	91 ± 3 (3)
TPCK	0.1 mM	92 ± 11 (3)
Aprotinin	0.8 μM	81 ± 17 (3)
Leupeptin	20 μM	117 ± 18 (3)
Antipain	16.5 μM	83 ± 8 (3)
EDTA	2 mM	6 ± 3 (3)***
EGTA	2 mM	16 ± 1 (3)**
<i>o</i> -Phenanthroline	2 mM	107 ± 14 (3)
Pepstatin A	10 μM	102 ± 7 (5)
Bestatin	50 μM	118 ± 17 (3)
E-64	15 μM	113 ± 18 (3)
pCMB	0.1 mM	83 ± 2 (3)**
pHMB ^b	0.1 mM	73 ± 6 (6)
Cocktail	1% (vol/vol)	106 ± 9 (3)

^a Determined at pH 10.5 with 50 pmol Cry1Aa/mg of membrane protein. Data are means ± SEM of the number of experiments indicated in parentheses. Statistical analyses are for comparisons with the control values obtained in the absence of inhibitor.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

^b pHMB, *p*-hydroxymercuribenzoate.

TABLE 2. Effect of PMSF on the activity of Cry1 toxins

Toxin	Osmotic swelling rate ^a (% control activity)
Cry1Aa	317 ± 53 (3)*
Cry1Ab	152 ± 9 (3)*
Cry1Ac	321 ± 27 (3)**
Cry1Ca	458 ± 138 (5)*
Cry1Ea	531 ± 25 (3)***

^a Determined in the presence of 4 mM PMSF at pH 10.5 with 50 pmol toxin/mg of membrane protein for Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ea and with 150 pmol toxin/mg of membrane protein for Cry1Ca. Data are means ± SEM of the number of experiments indicated in parentheses. Statistical analyses are for comparisons with the control values obtained, for each toxin, in the absence of PMSF. *, $P < 0.06$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

TABLE 3. Effect of overnight incubation of Cry1Aa and brush border membrane vesicles with ethanol and PMSF

Concn added to brush border membrane vesicles ^a		Toxin ^b		Osmotic swelling rate ^c (% control activity)
Ethanol (%)	PMSF (mM)	Ethanol (%)	PMSF (mM)	
2				101 ± 11
	4			120 ± 7
		2		105 ± 11
			4	93 ± 12
2		2		101 ± 2
	4		4	109 ± 3

^a Brush border membrane vesicles were incubated overnight at 4 mg of membrane protein/ml in 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5) and the indicated amount of PMSF and ethanol. Prior to the experiments, the vesicles were diluted to a final concentration of 0.4 mg of membrane protein/ml with 10 mM CAPS-KOH and enough bovine serum albumin to achieve a final concentration of 1 mg/ml.

^b Cry1Aa was incubated overnight at 0.04 mg/ml in 150 mM KCl, 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5) and the indicated amount of PMSF or ethanol and added in the KCl solution before the osmotic swelling experiments.

^c Determined at pH 10.5 with 50 pmol Cry1Aa/mg of membrane protein. Data are means ± SEM of three experiments.

TABLE 4. Reversibility of the effect of EDTA by an excess of divalent cations

pH	[EDTA] ^a (mM)	[CaCl ₂] (mM)	[MgCl ₂] (mM)	[BaCl ₂] (mM)	Osmotic swelling rate ^b (% control activity)
7.5	0.4				38 ± 5***
	0.4	2			74 ± 1*
	0.4		2		119 ± 5
	0.4			2	78 ± 6
		2			75 ± 3*
			2		88 ± 5
				2	79 ± 4
10.5	0.2				8 ± 5***
	0.2	1			92 ± 10
		1			96 ± 3

^a EDTA was added to both the vesicle suspension and the KCl solution 10 min before the addition of CaCl₂, MgCl₂, or BaCl₂.

^b Determined with 50 pmol Cry1Aa/mg of membrane protein. Data are means ± SEM of three experiments. Statistical analyses are for comparisons with the control values obtained in the absence of inhibitor and added divalent cation. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

TABLE 5. Effect of EDTA on the activity of Cry1 toxins

Toxin	Osmotic swelling rate ^a (% control activity)
Cry1Aa	6 ± 3***
Cry1Ab	8 ± 8***
Cry1Ac	0.7 ± 0.4***
Cry1Ca	101 ± 2
Cry1Ea	5 ± 2***

^a Determined at pH 10.5, in the presence of 2 mM EDTA, with 50 pmol toxin/mg of membrane protein for Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ea and with 150 pmol toxin/mg of membrane protein for Cry1Ca. Data are means ± SEM of three experiments. Statistical analyses are for comparisons with the control values obtained in the absence of inhibitor. ***, $P < 0.001$.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Osmotic swelling of *M. sexta* midgut brush border membrane vesicles induced by various concentrations of Cry1Aa. Vesicles equilibrated in 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5) and 1-mg/ml bovine serum albumin were rapidly mixed with an equal volume of 150 mM KCl, 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5), 1-mg/ml bovine serum albumin and the indicated concentrations of toxin (in picomoles of toxin per milligram of membrane protein). Percent volume recovery was calculated for each experimental point, and the values measured for control vesicles, assayed in the absence of toxin, were subtracted from those obtained in the presence of toxin. Data are means \pm SEM of four experiments. For clarity, error bars are shown for every 100th experimental point.

FIG. 2. Osmotic swelling of midgut brush border membrane vesicles induced by Cry1Aa in the presence of PMSF (A) and EDTA (B). Vesicles were mixed with a solution containing 150 mM KCl, 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5), 1-mg/ml bovine serum albumin and 50 pmol Cry1Aa/mg of membrane protein. The vesicle suspension and the KCl solution contained 5 mM PMSF (+PMSF), 2.5% ethanol (−PMSF), or 2 mM EDTA (+EDTA). Data are means \pm SEM of three experiments. For clarity, error bars are shown for every 100th experimental point.

FIG. 3. Effect of PMSF concentration on the rate of pore formation by Cry1Aa in brush border membrane vesicles. Vesicles were mixed with a solution containing 150 mM KCl, 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5), 1-mg/ml bovine serum albumin, and 50 pmol Cry1Aa/mg of membrane protein. Data are means \pm SEM of three experiments. Asterisks indicate a significant difference ($P < 0.05$) relative to controls (0 mM PMSF).

FIG. 4. Effect of PMSF on the rate of pore formation by Cry1Aa. Vesicles were mixed with a solution containing 150 mM KCl, 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5), 1-mg/ml bovine serum albumin, and the indicated concentration of Cry1Aa (in picomoles of toxin per milligram of membrane protein). The experiments were performed without PMSF (■) and with 4 mM PMSF (●). Data are means \pm SEM of four (without PMSF) or five (with PMSF) experiments.

FIG. 5. Effect of PMSF additions during incubation of the vesicles with Cry1Aa. Vesicles were incubated for 60 min and mixed with a solution containing 150 mM KCl, 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5), and 1-mg/ml bovine serum albumin. Vesicles were incubated either without (Control) or with 50 pmol Cry1Aa/mg of membrane protein. Ethanol (2%) (None) or PMSF (4 mM) were added at the beginning of the incubation period, 10 min before the addition of the toxin (Start), or after an incubation of 50 min with the toxin (End). Percent volume recovery at 3 s (B) was derived from the experimental curves shown in panel A. Data are means \pm SEM of three experiments. Bars labeled with the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).

FIG. 6. Effect of EDTA and EGTA on the rate of pore formation by Cry1Aa. Vesicles were mixed with a solution containing 150 mM KCl and 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5) (A and B) or 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) (C), 1-mg/ml bovine serum albumin, and 50 pmol Cry1Aa/mg of membrane protein. The vesicle suspension and the KCl solution contained the indicated concentration of EDTA (A and C) or EGTA (B). Data are means \pm SEM of three experiments.

FIG. 7. Effect of EDTA and EGTA additions during incubation of the vesicles with Cry1Aa. Vesicles were incubated for 60 min and mixed with a solution containing 150 mM KCl and 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) (A and C) or CAPS-KOH (pH 10.5) (B and D) and 1-mg/ml bovine serum albumin. Vesicles were incubated either without (Control) or with 50 pmol Cry1Aa/mg of membrane protein. EDTA (A and B) or EGTA (C and D) were added at a final concentration of 2 mM at the beginning of the incubation period, 10 min before the addition of the toxin (Start), or after an incubation of 50 min with the toxin (End). Data are means \pm SEM of three experiments. Bars labeled with the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).

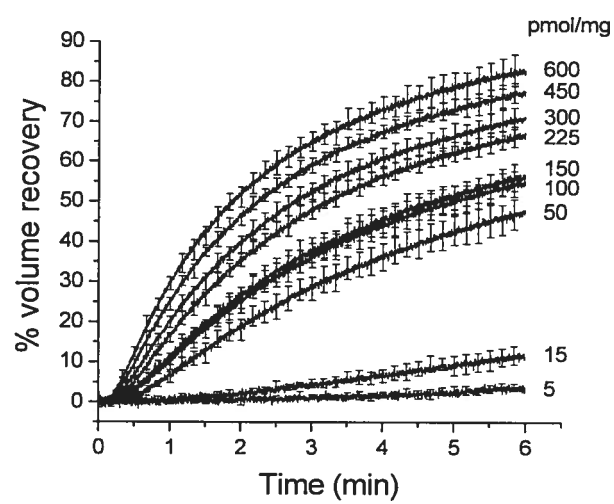
Figure 1

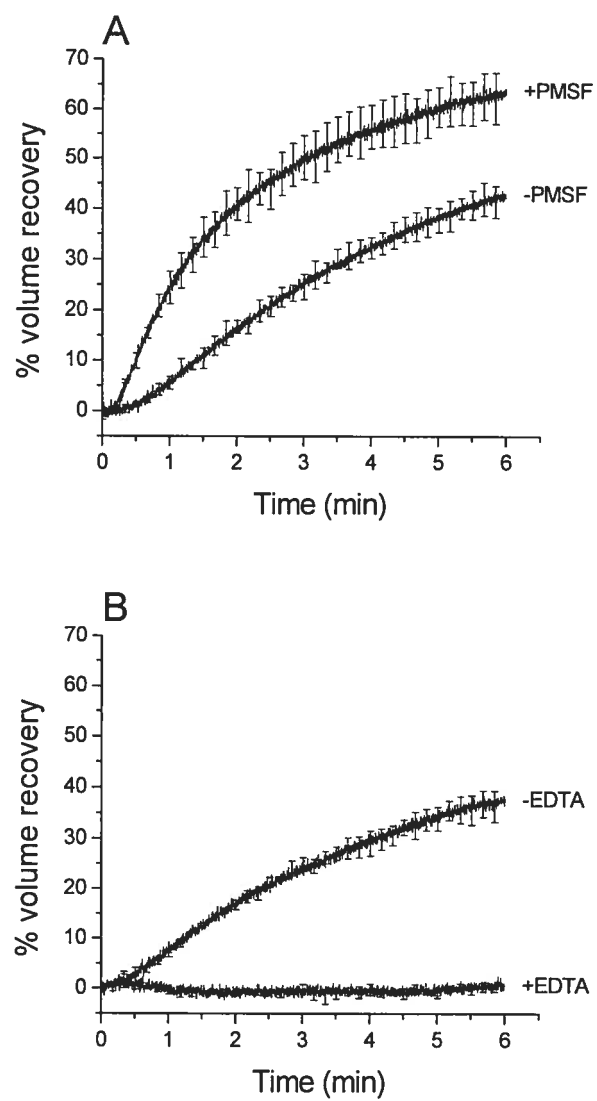
Figure 2

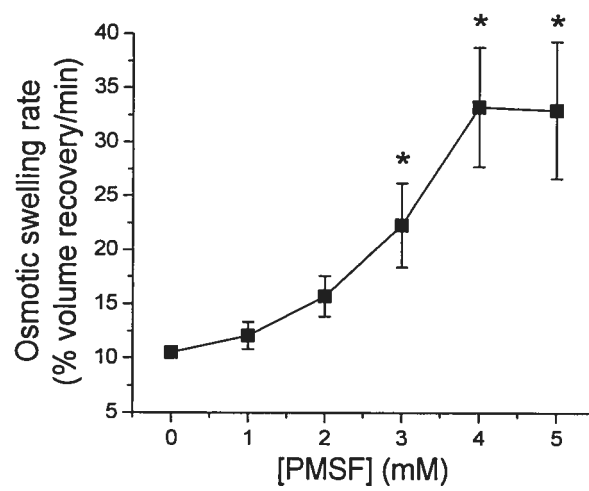
Figure 3

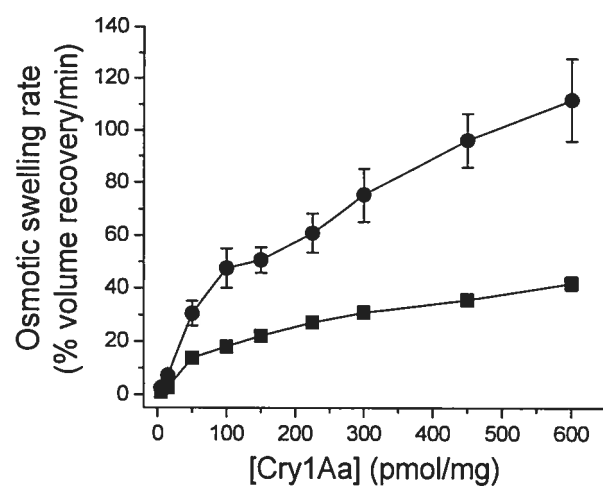
Figure 4

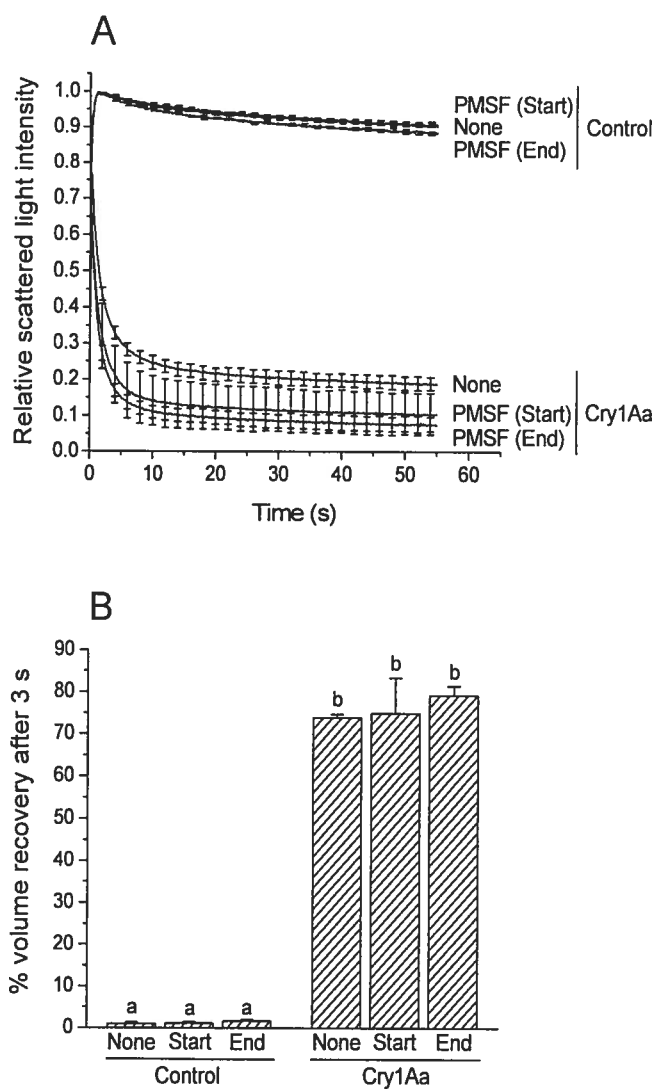
Figure 5

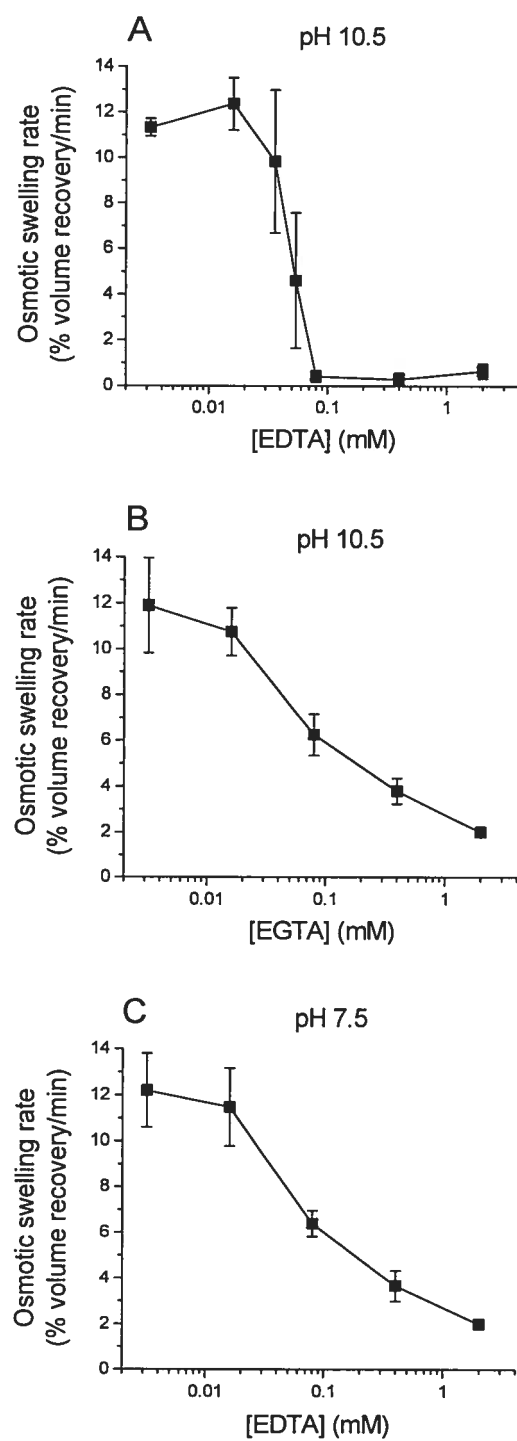
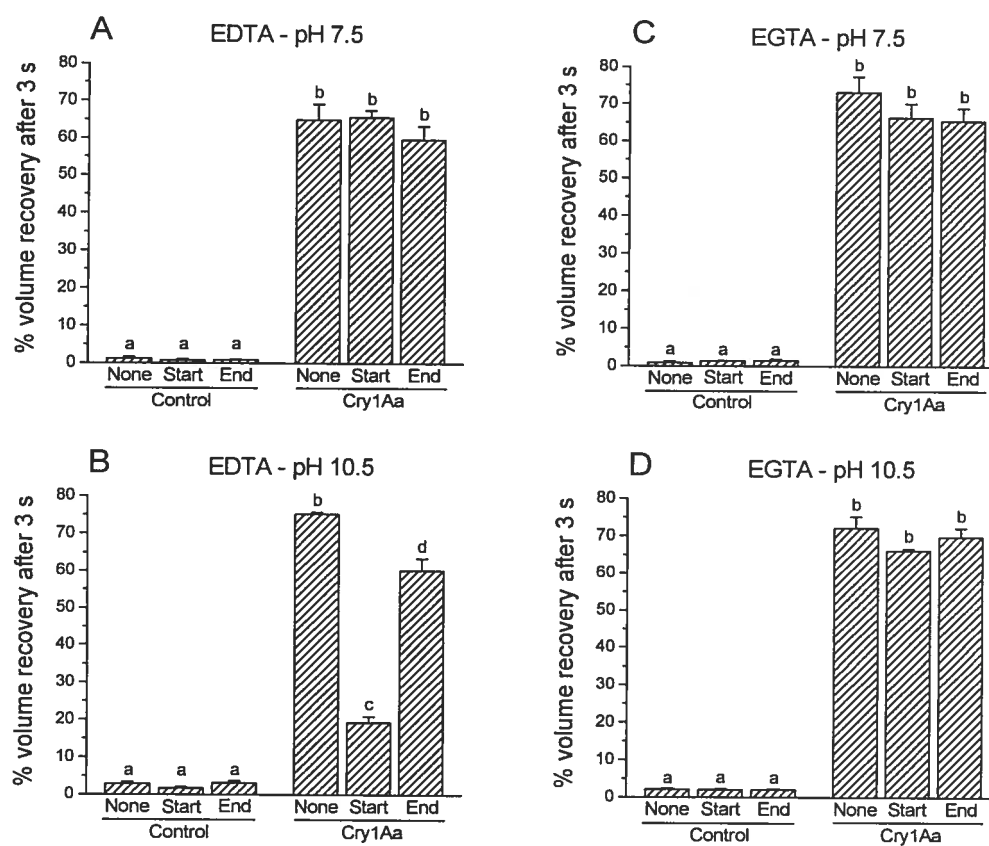
Figure 6

Figure 7

Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant

Martin Kirouac

Ph.D. physique – biophysique et physiologie moléculaire

Description de l'article

Titre : Protease Inhibitors Fail to Prevent Pore Formation by the Activated *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Aa in Insect Brush Border Membrane Vesicles

Auteurs : Martin Kirouac, Vincent Vachon, Delphine Quievy, Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade

Revue : Applied and Environmental Microbiology, janvier 2006, vol. 72, no. 1, pp. 506–515.

Déclaration des coauteurs

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Martin Kirouac inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Effets des toxines insecticides du bacille de Thuringe sur la perméabilité des vésicules de membrane à bordure en brosse intestinale du sphinx du tabac ».

Vincent Vachon :

Date : 21 juin 2006

Delphine Quievy

Date : 11 mai 2006

Jean-Louis Schwartz

Date : 21/06/2006

Raynald Laprade

Date : 20/06/2006

Permission de l'éditeur

1. Identification de la revue

Applied and Environmental Microbiology
American Society for Microbiology
1752 N Street, N.W.
Washington, DC 20036-2904

2. Identification de l'éditeur

Journals Dept.
Applied and Environmental Microbiology
American Society for Microbiology
1752 N Street, N.W.
Washington, DC 20036-2904


3. Identification de l'article

Titre : Protease Inhibitors Fail to Prevent Pore Formation by the Activated
Bacillus thuringiensis Toxin Cry1Aa in Insect Brush Border Membrane
Vesicles

Auteurs : Martin Kirouac, Vincent Vachon, Delphine Quievy, Jean-Louis Schwartz
et Raynald Laprade

Référence : Applied and Environmental Microbiology, janvier 2006, vol. 72, no. 1,
pp. 506–515.

PERMISSION GRANTED
CONTINGENT ON AUTHOR PERMISSION (which you must obtain)
AND APPROPRIATE CREDIT
American Society for Microbiology



CHAPITRE 6

A MECHANICAL FORCE CONTRIBUTES TO THE “OSMOTIC SWELLING” OF BRUSH BORDER MEMBRANE VESICLES

Martin Kirouac, Vincent Vachon, Mélanie Fortier, Marie-Claude Trudel,
Alfred Berteloot, Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade

Soumis au *Biophysical Journal* le 9 mai 2006.

Accepté le 18 juillet 2006 ; sous presse.

RÉSUMÉ

Une technique de gonflement osmotique utilisant des vésicules de membrane à bordure en brosse a été abondamment utilisée pour étudier la formation de pores par les toxines de *Bacillus thuringiensis*. À la suite d'un choc hypertonique, les vésicules purifiées de l'intestin moyen de *Manduca sexta* rétrécissent rapidement puis, plutôt que de reprendre leur volume initial tel que prédit par les modèles théoriques, regonflent partiellement jusqu'à un volume qui dépend de la perméabilité membranaire et de la concentration de toxine. Puisqu'un efflux de tampon des vésicules lors du rétrécissement pourrait contribuer à ce phénomène, les vésicules ont été mélangées avec une solution hypertonique du tampon avec lequel elles ont été chargées. Dans ces conditions, on ne s'attend pas à ce que les vésicules regonflent puisque le même soluté est présent de chaque côté de la membrane. Néanmoins, avec plusieurs tampons, les vésicules regonflent facilement, ce qui démontre la présence d'une force de restauration additionnelle. Le regonflement a aussi lieu lorsque, en absence de toxine, les tampons sont remplacés par le glucose, un soluté qui diffuse facilement au travers de la membrane, mais n'a pas lieu avec des microsomes de foie de rat malgré leur perméabilité au glucose. Un regonflement imprévu a aussi été observé avec des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées du jéjunum de lapin, ce qui suggère que le cytosquelette, présent dans les vésicules de membrane à bordure en brosse mais absent des microsomes, pourrait être responsable de la force de restauration.

A Mechanical Force Contributes to the “Osmotic Swelling” of Brush Border Membrane Vesicles

Martin Kirouac,^{*†} Vincent Vachon,^{*†} Mélanie Fortier,^{*†} Marie-Claude Trudel,^{*} Alfred Berteloot,^{*‡} Jean-Louis Schwartz,^{*‡} and Raynald Laprade^{*†}

^{*}Groupe d'étude des protéines membranaires; [†]Département de physique; and [‡]Département de physiologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

Running title: Osmotic Swelling of Membrane Vesicles

Address reprint requests to Raynald Laprade, Groupe d'étude des protéines membranaires, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Centre Ville Station, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada. Phone: (514) 343-7960; Fax: (514) 343-7146; E-mail:

[REDACTED]

ABSTRACT Brush border membrane vesicles and an osmotic swelling assay have been used extensively to monitor the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* toxins. Following a hypertonic shock, *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles shrink rapidly and re-swell partially to a volume that depends on membrane permeability and toxin concentration rather than re-gaining their original volume as expected from theoretical models. Because efflux of buffer from the vesicles, as they shrink, could contribute to this phenomenon, vesicles were mixed with a hypertonic solution of the buffer with which they were loaded. Under these conditions, they are not expected to re-swell since the same solute is present on both sides of the membrane. Nevertheless, with several buffers, vesicles re-swelled readily, an observation which demonstrates the involvement of an additional restoration force. Re-swelling also occurred when, in the absence of toxin, the buffers were replaced by glucose, a solute which diffuses readily across the membrane, but did not occur with rat liver microsomes, despite their permeability to glucose. Unexpected swelling was also observed with rabbit jejunum brush border membrane vesicles suggesting that the cytoskeleton, present in brush border membrane vesicles but absent from microsomes, could be responsible for the restoration force.

INTRODUCTION

An osmotic swelling assay based on light-scattering measurements is a convenient technique for monitoring continuously the flux of ions or neutral molecules across the membrane of cells or vesicles (1,2). It is usually assumed that, following a hypertonic shock and the resulting initial shrinking, the swelling of the cells or vesicles is due to the entry of water accompanying solute influx driven by the chemical gradient across the membrane (1,2). It has also been suggested that the vesicles could have some restoration forces originating from the elasticity of the membrane and the Donnan effect (1,3), and from the buildup of an internal hydrostatic pressure as the vesicles shrink (4). The light-scattering assay has proven very useful to monitor the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in lepidopteran midgut brush border membrane vesicles (2). Once activated by insect midgut proteases, *B. thuringiensis* Cry toxins bind to specific receptors at the surface of midgut epithelial cells and form lethal transmembrane channels (5). The pores formed by these toxins allow the passage of monovalent and divalent anions and cations and relatively large solutes such as sucrose, raffinose and polyethylene glycols (2,6–11). In receptor-free planar lipid bilayers, the Cry1Ca toxin at high concentrations forms clusters composed of a variable number of similar channels each having a maximal pore radius of 1.0–1.3 nm (12). The osmotic swelling assay has been used extensively to study the effect of specific mutations (7,10,11,13,14), differential effects of pH (8,15) and ionic strength (15), and the influence of protease inhibitors (16) on the pore-forming properties of the toxins, and to investigate the ionic selectivity of their pores (9).

Despite extensive use of this technique, the kinetics of volume recovery of the vesicles are still not completely understood. Following an osmotic shock, in the presence of toxin, vesicles do not re-swell to their original volume but reach a constant volume that depends on membrane permeability and toxin concentration. To further characterize the osmotic properties of the vesicles, a series of experiments were performed with *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles. Membrane permeability was varied by the addition of the *B. thuringiensis* toxin Cry1Ac or the potassium ionophore valinomycin. The experimental results were compared with those predicted by a

mathematical model based on Fick's law of diffusion. Vesicle volume changes due to osmosis are described by Jacobs' equations (1,17,18) for vesicles loaded with an impermeant solute and mixed with both a permeant and an impermeant solute. However, since the pores formed by the toxin are relatively large and non-selective, Jacobs' model was modified to simulate volume changes resulting from the diffusion of two solutes: the buffer with which the vesicles are loaded and the solute used to impose the osmotic shock. Our results demonstrate that, in addition to the chemical gradient across the membrane, a mechanical restoration force contributes to vesicle re-swelling. This restoration force is also present in rabbit brush border membrane vesicles but not in rat liver microsomes.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of membrane vesicles

Fertilized *M. sexta* eggs were purchased from the North Carolina State University Entomology Department insectary (Raleigh, NC) and reared on a standard synthetic medium supplied with the insects. Whole midguts were isolated from 5th-instar larvae, freed of attached Malpighian tubules and luminal contents, and rinsed thoroughly with ice-cold 300 mM sucrose, 17 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 5 mM EGTA. Brush border membrane vesicles were prepared with a magnesium precipitation and differential centrifugation technique (19). The final membrane preparation was resuspended in 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5, and stored at -80°C until use.

Rat liver microsomes were prepared with the method of van de Werve (20) with some modifications. Livers from overnight-fasted male Wistar rats (225–250 g) (Charles River, Saint-Constant, Qc) were removed, perfused with ice-cold 0.9% (w/v) NaCl and homogenized on ice in 4 ml/g of tissue of 250 mM sucrose, 50 mM Hepes-Tris, pH 7.3, in a Waring blender for 30 s at full speed. The homogenate was then passed 10 times in a Potter homogenizer and centrifuged for 10 min at $1\,000 \times g$. The resulting supernatant was spun at $12\,000 \times g$ for 20 min and the second supernatant was centrifuged at

100 000 \times g for 60 min. The pellet was resuspended in 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3, centrifuged at 100 000 \times g for 60 min, resuspended in the same solution and stored in liquid nitrogen until use.

The proximal small intestines of male New Zealand White rabbits (1.7–2 kg) (Charles River) were removed and flushed with ice-cold 0.9% (w/v) NaCl. Jejunal brush border membrane vesicles were prepared with a magnesium precipitation and differential centrifugation technique (21,22). The final membrane preparation was resuspended in 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3, and stored in liquid nitrogen until use.

Toxin

The Cry1Ac protoxin was produced from *B. thuringiensis* strain HD73, solubilized, trypsin-activated, and purified by fast protein liquid chromatography as described earlier (23,24).

Light-scattering assay

Membrane permeability was analyzed using an osmotic swelling technique based on light-scattering measurements (1,2). In preparation for the experiments, *M. sexta* vesicles were diluted with the appropriate buffer to about 90% of the desired final volume and allowed to equilibrate overnight at 4°C. Before the beginning of the experiments, they were diluted to 0.4 mg of membrane protein/ml and with enough bovine serum albumin to achieve a final concentration of 1 mg/ml. Rabbit vesicles and rat microsomes were diluted directly to 0.4 mg of membrane protein/ml without bovine serum albumin. Rabbit vesicles were allowed to equilibrate overnight at 4°C and microsomes were allowed to equilibrate for at least 60 min at 4°C. In some experiments, for comparison with rabbit vesicles and microsomes, *M. sexta* vesicles were diluted directly to 100% of the desired volume without bovine serum albumin. Vesicles and microsomes were warmed up to 23°C and rapidly mixed with an equal volume of a

hypertonic solution using a stopped-flow apparatus (Hi-Tech Scientific Co., Salisbury, UK). When *M. sexta* vesicles were permeabilized with the *B. thuringiensis* toxin, the vesicles were first incubated with the indicated concentration of toxin for 60 min at 23°C and then submitted to the hypertonic shock. In some experiments, while the vesicles were warming up, the indicated concentrations of valinomycin (Sigma, St. Louis, MO) were added, from a stock solution of 5 mM in ethanol, to both the vesicle suspension and the KSCN solution used for imposing the hypertonic shock. Scattered light intensity was monitored with a photomultiplier tube located at 90° from the incident light beam in a Spex Fluorolog CM-3 spectrofluorometer (Jobin Yvon Horiba, Edison, NJ) at a wavelength of 450 nm and a frequency of 10 Hz for most experiments or 400 Hz for the study of the water permeability of the vesicles. In some experiments, designed to study the influence of the refractive index of the solutions on scattered light intensity, vesicles were replaced by a 0.004% (v/v) suspension of polystyrene latex beads (diameter of 105 nm) (Sigma). The refractive index of the solutions was measured with a Reichert AR 200 refractometer (Reichert Analytical Instruments, Depew, NY).

Data analysis

Scattered light intensity measurements were normalized as follows: the value of 0 was attributed to the intensity measured when the vesicles were diluted with the same solution as that with which they were loaded and the value of 1 was attributed, unless specified otherwise in the figure legends, to the highest intensity measured for a particular set of experiments. Percent volume recovery was defined as $100(1-I_t)$ where I_t is the relative scattered light intensity measured at a given time t . Data are means \pm standard error of the mean of at least three experiments, each performed with a different vesicle preparation. Experimental values for each individual experiment consist of the average of five replicates obtained using the same vesicle preparation. For the study of the water permeability of the vesicles, experimental curves were fitted with the following single exponential function (25) to find the half shrinking time ($t_{1/2}$) of the vesicles:

$$I = I_{Max}(1 - \exp(-\kappa t)) \quad (1)$$

where I is the relative scattered light intensity at time t , I_{Max} is the maximum relative scattered light intensity reached and κ is a rate constant ($\kappa = \ln(2)/t_{1/2}$). Statistical comparisons were made with the two-tailed unpaired Student's t -test.

Osmotic swelling simulations

The differential equations developed to describe variations in the volume of the vesicles were solved using a Runge-Kutta algorithm, programmed in Fortran 77 and compiled on a Unix platform. For the purpose of the simulations, vesicles are considered as spheres initially having a diameter of 100 nm, a size that is within the range of those measured for mammalian brush border membrane vesicles (see 25 for example) and a good approximation of those estimated from electron micrographs of lepidopteran midgut brush border membrane vesicles (see 19 for example). The water permeability (P_w) was set at 9×10^{-13} cm³/s, a value which allows the vesicles to shrink completely in approximately 0.2–0.3 s, corresponding to the shrinking time of *M. sexta* brush border membrane vesicles in our standard osmotic swelling assay used to monitor *B. thuringiensis* toxin activity (8,9). Since the permeabilities to the solutes were adjusted so that the rates of vesicle volume changes corresponded approximately to those observed in the *in vitro* assay, simulations using somewhat smaller or larger vesicles would yield similar results. For simplicity, the molar volume of the solutes (v_A and v_B) were set equal to that of water (v_w) (18 cm³/mole). In these simulations, the volume occupied by the solutes is very small in comparison with that occupied by water. The volume of the vesicles (V) was calculated for each value of time and converted to relative volume. In each set of simulations, the value of 0 was attributed to the smallest volume reached and the value of 1 was attributed to the initial volume of the vesicles. Simulations are presented as 1 minus the relative volume to facilitate comparisons with the data derived from light-scattering experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Membrane permeability induced by the *B. thuringiensis* toxin Cry1Ac

M. sexta midgut brush border membrane vesicles loaded with 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5, were incubated for 60 min with Cry1Ac and submitted to a hypertonic shock by mixing them with an equal volume of the same buffer supplemented with 150 mM KCl or 300 mM sucrose (Fig. 1). Due to the osmotic shock, water exited from the vesicles and their volume decreased rapidly as evidenced by a sharp rise in scattered light intensity. Then, vesicles re-swelled and subsequently recovered some of their original volume. As was observed in previous studies on *B. thuringiensis* toxins (2,7–11,15,16), vesicles re-swelled partially to a volume that depended on membrane permeability rather than re-gaining their original volume. The rate and magnitude of vesicle swelling, which depend on the permeability of the membrane to the solute, increased, as expected, with toxin concentration. Vesicles re-swelled faster with KCl than with sucrose, in agreement with previous studies (2,8).

Relation between vesicle volume and scattered light intensity

M. sexta vesicles loaded with 1, 10 or 100 mM Hepes-KOH, pH 7.5, were rapidly mixed with an equal volume of solutions containing various concentrations of KCl (Fig. 2). The volume of the vesicles decreased as indicated by a rise in scattered light intensity when the ratio between the osmolarities inside and outside the vesicles is less than 1. In the standard assay used to test the activity of *B. thuringiensis* toxins (Fig. 1), the initial ratio between the osmolarities inside and outside the vesicles is approximately 0.09. Therefore, in Fig. 2, to facilitate comparisons with the results obtained with the standard assay, scattered light intensities were normalized with those measured for this ratio. Since the relation between scattered light intensity and the ratio between the osmolarity inside and outside the vesicles was not always linear, the vesicles did not appear to shrink as expected for ideal osmometers and predicted by the Boyle-Van't Hoff relation

(26). The relation tended to become somewhat more linear when the osmolarity of the buffer solution with which the vesicles were loaded was increased from 1.5 (Fig. 2 *A*) to 15 mOsm/l (Fig. 2 *B*), as in the standard assay, or 150 mOsm/l (Fig. 2 *C*). In the experiments illustrated in Fig. 2, *A* and *B*, the vesicle volume never seemed to reach a minimum even for the smallest ratios tested.

Variations in scattered light intensity are influenced by the refractive index of the surrounding medium (27,28). In order to test how the variation in refractive index of the KCl solutions influenced the scattered light intensity measurements shown in Fig. 2, the vesicles were replaced by a suspension of nonosmotically sensitive polystyrene latex beads. Since salt-induced aggregation of latex beads has been reported (29), the KCl solutions were replaced by solutions of sucrose having the same refractive index. No significant change in scattered light intensity attributable to changes in the refractive index of the solutions was observed under the conditions used for the experiment illustrated in Fig. 2 *A*. Changes in the refractive index accounted for 0.09 ± 0.01 and 0.17 ± 0.03 relative scattered light intensity units, between the smallest and highest osmolarity ratios, in Fig. 2 *B* and *C*, respectively, and for less than 0.05 units between the osmolarity ratios of 0.09 and 1, in both experiments. Even if changes in refractive index slightly influenced the scattered light intensities, these changes were too small, in comparison with those due to changes in volume, to explain the shape of the curves presented in Fig. 2 or the differences observed between Fig. 2, *A–C*.

A possible non-linear relation between the volume of the vesicles and scattered light intensity, potential structural limitations of the membrane or a non-negligible permeability of the membrane to KCl and to Hepes-KOH could possibly contribute to the fact that, in Fig. 2, the volume of the vesicles does not appear to vary as expected for an ideal osmometer. A non-linear relation between scattered light intensity and imposed osmotic gradient has already been reported for *M. sexta* midgut vesicles loaded with 10 mM Ches-KOH and submitted to various hypertonic solutions of KCl (6). However, this result contrasts with those of other studies that report a quasi-linear relation for hog gastric vesicles (30), rabbit renal brush border membrane vesicles (31) and rabbit renal basolateral membrane vesicles (32). Worman and Field (33) reported a deviation from linearity when rat small intestine brush border membrane vesicles were submitted to

large osmotic gradients. In these studies, vesicles were loaded with solutions having an osmolarity comparable (102 mOsm/l) (33) or superior (from 265 to 320 mOsm/l) (30–32) to that of the solutions used to load the vesicles in the experiments illustrated in Fig. 2. They were also submitted to a smaller range of osmolarity ratios, thus avoiding the region where the ratio between the osmolarity inside and outside the vesicles is smaller than 0.2, in which the curve shown in Fig. 2 *C* deviates most from linearity. A quasi-linear relation was also observed for rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles over a range of osmolarity ratios similar to that shown in Fig. 2 *C* (34), but these experiments are difficult to compare with those illustrated in Fig. 2 since, in contrast with our experimental design, the osmolarity inside the vesicles was varied and the osmolarity outside the vesicles was kept constant.

In the standard assay (Fig. 1), the relative scattered light intensity varies between 1, at the apex of the control curves recorded without toxin, and 0.2–0.4, 60 s after the osmotic shock at saturating toxin concentrations. Within this range, the calibration curve is reasonably linear (Fig. 2 *B*). At saturating toxin concentrations, scattered light intensities never returned to the value measured in the absence of an osmotic shock. According to experiments performed with latex beads, this cannot be due to changes in the refractive index between the Hepes-KOH and the KCl solutions. Furthermore, this cannot be explained by a direct effect of the toxin on scattered light intensity since no change in this parameter was observed in the absence of an osmotic shock when vesicles incubated with toxin were mixed with the solution with which they were loaded (2). The observation that the vesicles never appear to regain their initial volume may suggest that the vesicle preparations could be contaminated with membranes other than the brush border membrane, such as the basolateral membrane in which the toxin is unable to form pores (35,36). To test this hypothesis, experiments similar to those illustrated in Fig. 1 were performed with vesicles loaded with Hepes-KOH and exposed to a hypertonic solution of KSCN in the presence of various concentrations of valinomycin (Fig. 3). Vesicles re-swelled at a rate that depended on valinomycin concentration. At low valinomycin concentrations, the rate of vesicle swelling is limited by the valinomycin-induced membrane permeability to potassium ions, while at high concentrations, the rate of vesicle swelling is limited by the finite membrane permeability to thiocyanate ions.

Results obtained with valinomycin (Fig. 3) are similar to those obtained with the toxin (Fig. 1) and, even at high valinomycin concentrations, vesicles never regained their initial volume. This had already been observed with *M. sexta* vesicles (2) and with rabbit sarcoplasmic reticulum vesicles (34). Thus, the presence of other membranes cannot explain why, in Fig. 1, scattered light intensities never returned to their initial values even at saturating toxin concentrations.

Simulation of volume changes

A model based on Fick's law of diffusion, similar to that proposed by Jacobs (17), was developed to analyze the theoretical effect of various factors on vesicle swelling. To simulate changes in the volume of vesicles having a permeability not only to one but to two solutes, a third differential equation was added to those of Jacobs (17). The theoretical vesicles contain X_A moles of solute A, X_B moles of solute B and X_W moles of water and have the permeabilities across the membrane (in cm^3/s) P_A , P_B and P_W for solutes A and B and for water, respectively. At time 0, the vesicles are mixed with A and B at the osmolarities C_A and C_B . It is assumed that both osmolarities do not change over time. The following equations describe the variation in the number of moles of A, B and water inside the vesicles over time t :

$$\frac{dX_A}{dt} = P_A \left(C_A - \frac{X_A}{V} \right) \quad (2)$$

$$\frac{dX_B}{dt} = P_B \left(C_B - \frac{X_B}{V} \right) \quad (3)$$

$$\frac{dX_W}{dt} = P_W \left[\frac{X_A + X_B}{V} - (C_A + C_B) \right] \quad (4)$$

The volume V of the vesicles can be calculated for each value of t with the following equation:

$$V(t) = v_A X_A(t) + v_B X_B(t) + v_W X_W(t) \quad (5)$$

where v_A , v_B and v_W are respectively the molar volumes of A, B and water. In Jacobs' equations, the permeabilities are given in cm/s and multiplied by the area of the

membrane. In our model, it is assumed that the area of the membrane does not change over time and the permeabilities are expressed directly in cm^3/s . Jacobs' equations were modified earlier by Johnson and Wilson (37) to include Staverman's reflection coefficient which is based on irreversible thermodynamics (18,38). This coefficient must be taken into account when experimental data are fitted with a theoretical model to determine the permeabilities of the membrane. However, since only qualitative comparisons between the experimental data and simulated experiments are presented in the present study, the reflection coefficient was neglected. Eqs. 2–4 were solved for various permeabilities P_A and P_B as described under Materials and Methods (Fig. 4). According to the simulations, if the membrane is only permeable to the solute used to impose the osmotic shock, the vesicles should re-swell to their initial volume at a rate that depends on the permeability of the membrane for this solute (Fig. 4 A). On the other hand, if the membrane is also permeable to the buffer with which the vesicles are loaded, they are predicted to regain only a fraction of their original volume depending on membrane permeability (Fig. 4 B). Efflux of buffer during the shrinking phase of the experiment could therefore tentatively explain why, in the osmotic swelling assay, the vesicles re-swelled only partially, even at saturating toxin concentrations (Fig. 1).

In this model, P_W was kept constant when the permeability to the solute was varied. However, since the pores formed by the toxin allow the diffusion of relatively large solutes, they are also expected to be permeable to water. Previous studies have reported an effect of Cry toxins on water permeability based on experiments in which the rate of vesicle shrinkage following an osmotic shock of KCl (39,40) or sucrose (2) increased as a function of toxin concentration. In order to test whether it was appropriate to use a constant P_W in the simulations, we first searched for a salt that is unable to diffuse through the pores formed by the toxin. An impermeable solute can be found based on the cationic selectivity of the pores (9,41–46) and the fact that osmotic swelling caused by a dissociated salt depends on the influx of both ion species and is limited by the rate of diffusion of the least permeable ion (2,8). Indeed, in agreement with the anion being the rate limiting species, amino acids bearing a net negative charge diffuse more slowly through the pores formed by *B. thuringiensis* toxins than neutral or positively charged amino acids (9). Also, slower diffusion rates were observed for the potassium salts of

divalent anions than for the chloride salts of divalent cations (9). Consequently, at pH 7.5, the permeability to a solute composed of a trivalent anion, such as Tris-citrate, is expected to be very low. This hypothesis was confirmed with experiments performed with *M. sexta* vesicles loaded with 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5, incubated for 60 min with various concentrations of Cry1Ac and mixed with a solution composed of 150 mM Tris-citrate and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5 (Fig. 5 A). In the absence of toxin, the membrane has a small permeability to Tris-citrate. Increasing toxin concentration caused the vesicles to shrink to a smaller volume rather than increasing the rate and extent at which they re-swelled. This observation probably results from the inability of Tris-citrate to diffuse across the pores formed by the toxin and from a non-negligible permeability of these pores to Hepes-KOH that overcomes the endogenous permeability of the membrane to Tris-citrate. Thus, Hepes-KOH could leak out of the vesicles in response to its increased concentration following vesicle shrinking. Such a permeability to Hepes-KOH is not apparent in Fig. 1 probably because the pores are more permeable to KCl and sucrose than to Hepes-KOH.

To test the water permeability of the pores, vesicles were therefore loaded with 10 mM Tris-citrate, pH 7.5, incubated with various concentrations of Cry1Ac and submitted to a hypertonic solution of 150 mM Tris-citrate (Fig. 5 B). The curves were then fitted with Eq. 1. The half shrinking times ($t_{1/2}$) of the vesicles calculated in the presence of 0, 5, 15, 50, 100 and 150 pmol of toxin/mg membrane protein were equal to 49 ± 2 , 46 ± 1 , 45 ± 3 , 41 ± 1 , 41 ± 2 and $40 \pm 2 \times 10^{-3}$ s, respectively. Only $t_{1/2}$ values calculated for 50, 100 and 150 pmol of toxin/mg membrane protein were significantly different ($p < 0.05$) from the value obtained without toxin. The rates of vesicle shrinking induced by Tris-citrate and calculated from the initial slopes of the curves shown in Fig. 5 B were not significantly different from each other ($p > 0.05$). Since the toxin did not change substantially the already large water permeability of the membrane, it appears justified to use a constant water permeability, as a reasonable approximation, in the simulations presented in Fig. 4.

Effect of the buffer permeability of the pores formed by Cry1Ac on vesicle swelling

Since valinomycin is very selective for potassium ions, no efflux of buffer is expected through this ionophore. In contrast with the prediction of the model (Fig. 4 *A*), the results obtained with valinomycin (Fig. 3) were similar to those obtained with the toxin (Fig. 1). As another means of testing the hypothesis that efflux of buffer during the shrinking phase of the experiment could explain why the vesicles re-swelled to a volume that depended on toxin concentration, experiments similar to those illustrated in Fig. 1 were performed with vesicles loaded with 10 mM Tris-citrate, pH 7.5, and mixed with 150 mM KCl and 10 mM Tris-citrate, pH 7.5 (Fig. 6). To summarize a large number of similar experiments and to facilitate their comparison, data are presented as percent volume recovery values measured after 30 s. Replacing Hepes-KOH by Tris-citrate did not change significantly the rate and extent of vesicle swelling in the presence of KCl. Therefore, efflux of buffer during the shrinking phase of the experiment cannot explain why the vesicles re-swell only partially since this is also observed when buffer efflux is prevented by replacing the toxin by valinomycin and in the presence of an impermeable buffer, Tris-citrate. A possible explanation may be that the large extent of shrinking may alter the mechanical integrity of the vesicles and prevent them from completely resuming their original volume over the time course of the experiments.

Re-swelling in the presence of the same solute inside and outside the vesicles

Vesicles are not expected to re-swell when they are mixed with a hypertonic solution of the buffer with which they are loaded since they should only shrink until the buffer concentration becomes equal on both sides of the membrane. Because solute influx can occur as the vesicles shrink, however, the model predicts that the vesicles will only shrink to a volume that depends on the permeability of the membrane to the solute (Fig. 7 *A*). However, when incubated with Cry1Ac, vesicles loaded with 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5, re-swelled readily after having been mixed with 150 mM Hepes-KOH, pH 7.5 (Fig. 7 *B*). This result suggests the involvement of an additional restoration force that

allows the vesicles to re-swell when they are mixed with a hypertonic solution of the buffer with which they are loaded. Furthermore, in contrast with the simulations (Fig. 7 A), even at saturating toxin concentrations, the actual vesicles shrank to a volume close to that attained in the absence of toxin (Fig. 7 B). This indicates that the toxin can only permeabilize the membrane to a certain extent that is probably limited by the number of toxin receptors present at the surface of the membrane. In order to model vesicle re-swelling under these conditions, a term describing a hypothetical “mechanical force” can be added to Eq. 4 which becomes:

$$\frac{dX_w}{dt} = P_w \left[\frac{X_A + X_B}{V} - (C_A + C_B) \right] - P_w k C_w \left(1 - \frac{V_0}{V} \right) \quad (6)$$

where C_w is the concentration of water, V_0 is the initial volume of the vesicles and k is a return constant. The mechanical term is equal to zero, before shrinking, when the volume of the vesicles is equal to their initial volume, and opposes shrinking increasingly as the volume of the vesicles decreases. When Eq. 4 is replaced by Eq. 6, the model predicts that the vesicles should re-swell even when they are mixed with a hypertonic solution of the buffer with which they are loaded (Fig. 7 C). In agreement with this prediction, vesicles loaded with 10 mM KCl and 0.1 mM Hepes-KOH, 20 mM sucrose and 0.1 mM Hepes-KOH, 10 mM imidazole-HCl, 10 mM Tris-HCl or 10 mM Caps-KOH and mixed with a hypertonic solution of the same compounds re-swelled readily (Fig. 7 D). In contrast, volume recoveries of only about 5% were observed with Tris-citrate in the presence and absence of toxin (Fig. 7 D) in agreement with the small permeability of the membrane for this solute which cannot be increased by the addition of toxin (Fig. 5 A). In these experiments, the pH of the imidazole-HCl, Tris-HCl, Hepes-KOH and Caps-KOH solutions were adjusted to the pKa of the organic species to ensure the presence of an equal ratio between the charged and uncharged species of each buffer. A small concentration of Hepes-KOH was kept in the solutions of KCl and sucrose used to load the vesicles to maintain a constant pH. In agreement with a cationic selectivity of the pores, similar percent volume recoveries were observed with imidazole-HCl, Tris-HCl, and KCl, irrespective of the size of the cation. Lower percent volume recovery values were recorded for Caps-KOH and Hepes-KOH although similar levels were reached for both buffers which are composed of a larger anion. In the presence of an

osmotic shock of KCl, vesicle swelling was remarkably similar for vesicles loaded with 10 mM Hepes-KOH or with 10 mM KCl and 0.1 mM Hepes-KOH (Fig. 7 *E*). In the presence of sucrose, vesicle swelling was only slightly lower when the vesicles were loaded with 20 mM sucrose and 0.1 mM Hepes-KOH than when they were loaded with 10 mM Hepes-KOH (Fig. 7 *E*). Taken together, these results strongly suggest that, in the standard osmotic swelling assay, a mechanical force contributes substantially to the osmotic swelling of the vesicles. They also stress that whatever the driving force, the rate and extent of vesicle swelling after the initial shrinking is controlled by the membrane permeability to the solute.

As a corollary, the mechanical force added in Eq. 6 that promotes vesicles re-swelling also imposes a constraint on vesicle shrinking and may explain why, in the absence of toxin, the vesicles do not appear to shrink as expected from ideal osmometers in Fig. 2. When $k \neq 0$ and the simulated vesicles loaded with 1.5, 15 or 150 mM of solute A are mixed with hypertonic solutions of solute A (or with a mixture of solutes A and B) Eq. 6 predicts non-linear relationships between the minimum volume of the vesicles (when $dX_w/dt = 0$) and the ratio between the intravesicular and extravesicular osmolarities (Fig. 8) which follow a pattern which is remarkably similar to that measured experimentally (Fig. 2). As Fig. 2, Fig. 8 shows that for the same osmolarity ratios, the curves become increasingly linear as the intravesicular osmolarity is increased (Fig. 8, from *A* to *C*). Thus, the same hypothetical mechanical force can explain not only why the vesicles re-swelled in the presence of toxin when the osmotic shock was imposed with the same solute as that with which the vesicles were loaded, but also why they did not shrink as expected from ideal osmometers.

Origin of the restoration force

Experiments that highlight the additional restoration force can also be performed without prior membrane permeabilization with toxin or valinomycin. *M. sexta* vesicles loaded with 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3, were mixed with an equal volume of the same buffer supplemented with 400 mM sucrose or glucose (Fig. 9 *A*). In agreement with previous

work (2), glucose diffused readily across the midgut membrane of *M. sexta* while sucrose was impermeant. Re-swelling was also observed when *M. sexta* vesicles were loaded with 20 mM glucose and 1 mM Hepes-Tris, and submitted to a hypertonic shock of glucose (Fig. 9 B). Similar experiments were conducted with rat liver microsomes (Fig. 9, C and D), also known to be more permeable to glucose than to sucrose (47). In contrast with *M. sexta* vesicles, and despite their larger permeability to glucose than to sucrose (Fig. 9 C), microsomes loaded with glucose and mixed with a hypertonic solution of glucose re-swelled at the same rate as those mixed with sucrose (Fig. 9 D). These results clearly show that the mechanical restoration force is much weaker in the microsomes than in the vesicles.

To test whether a restoration force is also present in other types of brush border membrane vesicles, experiments were carried out to compare vesicles prepared from rabbit jejunum and from *M. sexta* midguts. Insect vesicles, loaded with 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3, were first mixed with the same buffer supplemented with 150 mM KSCN (Fig. 10 A). Vesicles have a non-negligible endogenous permeability to KSCN that can be increased with the addition of valinomycin. *M. sexta* vesicles, also re-swelled readily when they were loaded with 10 mM KSCN and 1 mM Hepes-Tris, and mixed with a hypertonic solution of KSCN (Fig. 10 B). Rabbit brush border membrane vesicles also re-swelled readily after having been exposed to a hypertonic solution of KSCN whether they were loaded (Fig. 10 D) or not (Fig. 10 C) with KSCN. These results suggest that the cytoskeleton, present in brush border membrane vesicles but absent from microsomes, could be responsible for the restoration force.

The existence of a mechanical force does not question the interpretation of results presented in previous studies on *B. thuringiensis* toxins, in which the osmotic swelling assay was used to monitor toxin pore formation, since vesicle swelling only occurs when the membrane is permeable to the external solute. Furthermore, in these studies only qualitative comparisons were made between the swelling rates induced by the toxins. However, calculations of the permeability of the membrane to a solute from the results obtained with brush border membrane vesicles and an osmotic swelling assay should take into account the possible contribution of an additional mechanical force. The intrinsic mechanical and elastic properties of the membrane of liposomes and vesicles

have been studied in detail (4,48–52), but such forces could not explain our results since they are also expected to be present in microsomes and in brush border membrane vesicles. Re-swelling when the solute inside and outside the vesicles is the same has also been reported earlier. Kidney brush border membrane vesicles loaded with mannitol and submitted to a hypertonic shock of mannitol re-swelled but no re-swelling was observed when mannitol was replaced by cellobiose (4). These results were interpreted as indicating that kidney vesicles have a small membrane permeability to mannitol but are impermeable to cellobiose. In contrast with our experiments re-swelling took as much as 10 hours. It was proposed that following the osmotic shock and subsequent vesicle shrinking there remains a chemical gradient of mannitol probably due to a hydrostatic pressure caused by the presence of osmotically active molecules inside the vesicles. This hydrostatic pressure could play a similar role as our mechanical force added in Eq. 6 since it can also explain why kidney vesicles do not behave like perfect osmometers (4). However, in our experiments the amplitude of such a hydrostatic force should be rather small since osmotically active molecules present inside the vesicles are expected to diffuse through the pores formed by the toxin during the 60 min incubation of the vesicles prior to the osmotic shock and during the vesicles shrinking phase of the experiments.

CONCLUSION

The above results strongly suggest that a mechanical force contributes to the re-swelling of brush border membrane vesicles following a hypertonic shock. This force could also explain why brush border membrane vesicles do not appear to shrink as expected for ideal osmometers. The fact that the mechanical force is much less evident in rat liver microsomes than in brush border membrane vesicles suggests that the cytoskeleton could be at its origin. Our results also clearly demonstrate that efflux of buffer during the shrinking phase of the osmotic swelling assay does not appear to be sufficient to explain why *M. sexta* brush border membrane vesicles re-swell partially to a volume that depends on membrane permeability induced by *B. thuringiensis* toxins or by

valinomycin since it occurs in the presence of an impermeant buffer. Even if the exact nature of the force that contributes to vesicle swelling following a hypertonic shock remains to be studied, the osmotic swelling assay remains a powerful tool to assess membrane permeability.

We thank Dr. Jacques Billette, Département de physiologie, Université de Montréal, for his help in dissecting the rabbits.

This work was supported by grants from the Biocontrol Network, the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Réseau québécois de recherche en phytoprotection and Valorisation-Recherche Québec.

REFERENCES

1. Kasai, M., and K. Nunogaki. 1988. Permeability of sarcoplasmic reticulum. *Methods Enzymol.* 157:437–468.
2. Carroll, J., and D. J. Ellar. 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* 214:771–778.
3. Kasai, M. 1980. Inulin exclusion volume of sarcoplasmic reticulum vesicles under various solvent conditions. *J. Biochem.* 88:1081–1085.
4. Soveral, G., R. I. Macey, and T. F. Moura. 1997. Mechanical properties of brush border membrane vesicles from kidney proximal tubule. *J. Membr. Biol.* 158:209–217.
5. Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775–806.
6. Carroll, J., and D. J. Ellar. 1997. Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* 245:797–804.
7. Coux, F., V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M. Bes, S. Rivest, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade, and R. Frutos. 2001. Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* 276:35546–35551.
8. Tran, L. B., V. Vachon, J.-L. Schwartz, and R. Laprade. 2001. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4488–4494.
9. Kirouac, M., V. Vachon, J.-F. Noël, F. Girard, J.-L. Schwartz, and R. Laprade. 2002. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1561:171–179.
10. Vachon, V., G. Préfontaine, F. Coux, C. Rang, L. Marceau, L. Masson, R. Brousseau, R. Frutos, J.-L. Schwartz, and R. Laprade. 2002. Role of helix 3 in pore

- formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry* 41:6178–6184.
11. Vachon, V., G. Préfontaine, C. Rang, F. Coux, M. Juteau, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, R. Frutos, R. Laprade, and L. Masson. 2004. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6123–6130.
 12. Peyronnet, O., B. Nieman, F. Génèreux, V. Vachon, R. Laprade, and J.-L. Schwartz. 2002. Estimation of the radius of the pores formed by *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1567:113–122.
 13. Wolfersberger, M. G., X. J. Chen, and D. H. Dean. 1996. Site-directed mutations in the third domain of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:279–282.
 14. Tigue, N. J., J. Jacoby, and D. J. Ellar. 2001. The α -helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5715–5720.
 15. Fortier, M., V. Vachon, M. Kirouac, J.-L. Schwartz, and R. Laprade. 2005. Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *J. Membr. Biol.* 208:77–87.
 16. Kirouac, M., V. Vachon, D. Quievy, J.-L. Schwartz, and R. Laprade. 2006. Protease inhibitors fail to prevent pore formation by the activated *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in insect brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:506–515.
 17. Jacobs, M. H. 1952. The measurement of cell permeability with particular reference to the erythrocyte. In: *Modern Trends in Physiology and Biochemistry*. E. S. G. Barron, editor. Academic Press, New York. 149–171.
 18. Kedem, O., and A. Katchalsky. 1958. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim. Biophys. Acta* 27:229–246.
 19. Wolfersberger, M., P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, F. V. Sacchi, B. Giordana, and G. M. Hanozet. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid

- transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86A:301–308.
20. van de Werve, G. 1989. Liver glucose-6-phosphatase activity is modulated by physiological intracellular Ca^{2+} concentrations. *J. Biol. Chem.* 264:6033–6036.
 21. Maenz, D. D., C. Chenu, F. Bellemare, and A. Berteloot. 1991. Improved stability of rabbit and rat intestinal brush border membrane vesicles using phospholipase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1069:250–258.
 22. Maenz, D. D., C. Chenu, S. Breton, and A. Berteloot. 1992. pH-dependent heterogeneity of acidic amino acid transport in rabbit jejunal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 267:1510–1516.
 23. Masson, L., G. Préfontaine, L. Péloquin, P. C. K. Lau, and R. Brousseau. 1989. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* 269:507–512.
 24. Masson, L., A. Mazza, L. Gringorten, D. Baines, V. Aneliunas, and R. Brousseau. 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* 14:851–860.
 25. van Heeswijk, M. P. E., and C. H. van Os. 1986. Osmotic water permeabilities of brush border and basolateral membrane vesicles from rat renal cortex and small intestine. *J. Membr. Biol.* 92:183–193.
 26. Nobel, P. S. 1969. The Boyle-Van't Hoff relation. *J. Theoret. Biol.* 23:375–379.
 27. Mar, T. 1981. Measurement of mitochondrial volume independent of refractive index by light scattering. *J. Biochem. Biophys. Methods* 4:177–184.
 28. Van der Goot, F., P. Ripoche, and B. Corman. 1989. Determination of solute reflection coefficients in kidney brush-border membrane vesicles by light scattering: influence of the refractive index. *Biochim. Biophys. Acta* 979:272–274.
 29. Carpineti, M., F. Ferri, and M. Giglio. 1990. Salt-induced fast aggregation of polystyrene latex. *Phys. Rev. A* 42:7347–7354.
 30. Rabon, E., N. Takeguchi, and G. Sachs. 1980. Water and salt permeability of gastric vesicles. *J. Membr. Biol.* 53:109–117.

31. Verkman, A. S., J. A. Dix, and J. L. Seifter. 1985. Water and urea transport in renal microvillus membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 248:F650–F655.
32. Verkman, A. S., and H. E. Ives. 1986. Water permeability and fluidity of renal basolateral membranes. *Am. J. Physiol.* 250:F633–F643.
33. Worman, H. J., and M. Field. 1985. Osmotic water permeability of small intestinal brush-border membranes. *J. Membr. Biol.* 87:233–239.
34. Kometani, T., and M. Kasai. 1978. Ionic permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles measured by light scattering method. *J. Membr. Biol.* 41:295–308.
35. Bravo, A., K. Hendrickx, S. Jansens, and M. Peferoen. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60:247–253.
36. Peyronnet, O., V. Vachon, R. Brousseau, D. Baines, J.-L. Schwartz, and R. Laprade. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1679–1684.
37. Johnson, J. A., and T. A. Wilson. 1967. Osmotic volume changes induced by a permeable solute. *J. Theoret. Biol.* 17:304–311.
38. Staverman, A. J. 1951. The theory of measurement of osmotic pressure. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 70:344–352.
39. English, L. H., T. L. Readdy, and A. E. Bastian. 1991. Delta-endotoxin-induced leakage of $^{86}\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ and H_2O from phospholipid vesicles is catalyzed by reconstituted midgut membrane. *Insect Biochem.* 21:177–184.
40. Slaney, A. C., H. L. Robbins, and L. English. 1992. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin CryIII A: an analysis of toxicity in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) and *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22:9–18.
41. Slatin, S. L., C. K. Abrams, and L. English. 1990. Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169:765–772.
42. Schwartz, J.-L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau, and E. Rousseau. 1993. Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 132:53–62.

43. Lorence, A., A. Darszon, C. Díaz, A. Liévano, R. Quintero, and A. Bravo. 1995. δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 360:217–222.
44. Schwartz, J.-L., Y.-J. Lu, P. Söhnlein, R. Brousseau, R. Laprade, L. Masson, and M. J. Adang. 1997. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* 412:270–276.
45. Schwartz, J.-L., L. Potvin, X. J. Chen, R. Brousseau, R. Laprade, and D. H. Dean. 1997. Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3978–3984.
46. Peyronnet, O., V. Vachon, J.-L. Schwartz, and R. Laprade. 2001. Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* 184:45–54.
47. Meissner, G., and R. Allen. 1981. Evidence for two types of rat liver microsomes with differing permeability to glucose and other small molecules. *J. Biol. Chem.* 256:6413–6422.
48. Li, W., T. S. Aurora, T. H. Haines, and H. Z. Cummins. 1986. Elasticity of synthetic phospholipid vesicles and submitochondrial particles during osmotic swelling. *Biochemistry* 25:8220–8229.
49. Sun, S.-T., A. Milon, T. Tanaka, G. Ourisson, and Y. Nakatani. 1986. Osmotic swelling of unilamellar vesicles by the stopped-flow light scattering method. Elastic properties of vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 860:525–530.
50. Ito, T., M. Yamazaki, and S.-I. Ohnishi. 1989. Osmoelastic coupling in biological structures: a comprehensive thermodynamic analysis of the osmotic response of phospholipid vesicles and a reevaluation of the “dehydration force” theory. *Biochemistry* 28:5626–5630.
51. Ertel, A., A. G. Marangoni, J. Marsh, F. R. Hallett, and J. M. Wood. 1993. Mechanical properties of vesicles. I. Coordinated analyses of osmotic swelling and lysis. *Biophys. J.* 64:426–434.

52. Hallett, F. R., J. Marsh, B. G. Nickel, and J. M. Wood. 1993. Mechanical properties of vesicles. II. A model for osmotic swelling and lysis. *Biophys. J.* 64:435–442.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1 Permeability of the pores formed by Cry1Ac to KCl and to sucrose in *M. sexta* midgut brush border membrane vesicles. *M. sexta* brush border membrane vesicles equilibrated overnight in 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5, were incubated for 60 min with the indicated concentrations of Cry1Ac (in pmol toxin/mg membrane protein). They were then mixed with an equal volume of the same solution as that with which they were loaded (Hepes-KOH) or with 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5, and (A) 150 mM KCl or (B) 300 mM sucrose. All solutions contained 1 mg/ml bovine serum albumin. For clarity, error bars are shown for every 25th experimental point.

FIGURE 2 Relation between scattered light intensity and volume of *M. sexta* vesicles. Vesicles incubated overnight in (A) 1, (B) 10 or (C) 100 mM Hepes-KOH, pH 7.5, were submitted to a hypertonic shock by mixing them rapidly with an equal volume of a solution containing the buffer with which they were loaded and enough KCl to reach the indicated osmolarity ratios. All solutions contained 1 mg/ml bovine serum albumin. The maximum scattered light intensity measured for each ratio was converted into relative scattered light intensity. The value of 0 was attributed to the intensity measured when the vesicles were diluted with the same solution as that with which they were loaded and the value of 1 was attributed to that reached when the osmolarity ratio was equal to 0.09.

FIGURE 3 Permeability of *M. sexta* vesicles to KSCN in the presence of various concentrations of valinomycin. Vesicles equilibrated in 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5, were mixed with an equal volume of the same solution as that with which they were loaded (Hepes-KOH) or with 150 mM KSCN and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5. The indicated concentration of valinomycin was added to both, the vesicle suspension and the solution used to impose the hypertonic shock. All solutions contained 1 mg/ml bovine serum albumin. For clarity, error bars are shown for every 50th experimental point.

FIGURE 4 Variations in the volume of the vesicles predicted by the mathematical model. The simulated vesicles are spheres having a diameter of 100 nm and containing 15 mOsm/l of solute A dissolved in water. At time 0, the vesicles are mixed instantaneously with a solution containing 15 mOsm/l of solute A and 150 mOsm/l of solute B. Membrane permeabilities to the different solutes were: (A) 0 or (B) $0.1 \times P_B$ for solute A and the indicated permeabilities (P_B) for solute B (in cm^3/s).

FIGURE 5 Permeability of the pores formed by Cry1Ac to Tris-citrate and to water. *M. sexta* vesicles equilibrated overnight in (A) 10 mM Hepes-KOH or (B) 10 mM Tris-citrate, pH 7.5, were incubated for 60 min with the indicated concentrations of Cry1Ac (in pmol toxin/mg membrane protein). They were then mixed with an equal volume of the same solution as that with which they were loaded (Hepes-KOH or Tris-citrate), or with (A) 150 mM Tris-citrate and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5, or (B) 150 mM Tris-citrate, pH 7.5. The value 0 was attributed to the scattered light intensity measured when the vesicles were diluted with the same solution as that with which they were loaded and the value 1 was attributed (A) to the maximum intensity reached without toxin or (B) to the mean intensity reached between 0.5 and 1 s. For clarity, error bars are shown for every (A) 25th or (B) 10th experimental point.

FIGURE 6 Effect of buffer composition on apparent membrane permeability to KCl. *M. sexta* vesicles were loaded with 10 mM Tris-citrate (■) or Hepes-KOH (▲), pH 7.5, and incubated for 60 min with the indicated concentrations of Cry1Ac. Vesicles were mixed with an equal volume of a solution containing 150 mM KCl and the buffer with which they were loaded. All solutions contained 1 mg/ml bovine serum albumin.

FIGURE 7 Changes in the volume of vesicles exposed to the same solute on both sides of the membrane. (A) Predicted volume of vesicles loaded with 15 mOsm/l of solute A and mixed with 150 mOsm/l of the same solute. The membrane has the indicated permeabilities (P_A) to the solute (in cm^3/s). In these simulations no solute B is present. (B) *M. sexta* vesicles loaded with 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5, and incubated for 60 min with the indicated concentrations of Cry1Ac (in pmol toxin/mg membrane

protein) were mixed with an equal volume of the same solution as that with which they were loaded (Hepes-KOH) or with 150 mM Hepes-KOH, pH 7.5. For clarity, error bars are shown for every 25th experimental point. (C) Modelling of vesicle volume was performed as in *A* except that Eq. 4 was replaced by Eq. 6 to take into account a mechanical force with $k = 2 \times 10^{-4}$. (D) The experiments were similar to those presented in panel *B*; Hepes-KOH, pH 7.5 (■), was replaced in both the solutions used for loading the vesicles and for the osmotic shock by the same concentrations of imidazole-HCl, pH 6.95 (◆), Tris-HCl, pH 8.1 (▲), Tris-citrate, pH 7.5 (▼), Caps-KOH, pH 10.5 (●), KCl (◄) or by isotonic solutions of sucrose (►). Solutions containing KCl and sucrose also contained 0.1 mM Hepes-KOH, pH 7.5. (E) Vesicles loaded with 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5, and incubated for 60 min with the indicated concentrations of Cry1Ac were mixed with an equal volume of a solution containing 150 mM KCl (●, Hepes-KOH/KCl) or 300 mM sucrose (■, Hepes-KOH/Sucrose) and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.5. Vesicles loaded with KCl were submitted to a hypertonic solution of KCl (◄, KCl/KCl) and vesicles loaded with sucrose were submitted to a hypertonic solution of sucrose (►, Sucrose/Sucrose). All solutions contained 1 mg/ml bovine serum albumin.

FIGURE 8 Theoretical relation between the volume of the vesicles and the ratio of the osmolarities inside and outside of the vesicles in the presence of a mechanical force and in the absence of toxin. The simulated vesicles contain (A) 1.5, (B) 15 or (C) 150 mM of solute A dissolved in water. The vesicles are mixed instantaneously with a solution containing enough solute A to reach the indicated osmolarity ratios. The minimum volume of the vesicles reached after equilibrium, when $dX_w/dt = 0$, was calculated with Eq. 6 with the return constant $k = 2 \times 10^{-4}$.

FIGURE 9 Comparison of the osmotic swelling of *M. sexta* brush border membrane vesicles and rat liver microsomes. (A and B) *M. sexta* vesicles or (C and D) rat microsomes were loaded with (A and C) 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3, or with (B and D) 20 mM glucose and 1 mM Hepes-Tris, pH 7.3, and mixed with an equal volume of (A and C) 400 mM sucrose and 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3 (Sucrose), or 400 mM glucose and 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3 (Glucose), (B and D) 400 mM sucrose, 20 mM glucose

and 1 mM Hepes-Tris, pH 7.3 (Sucrose), or 420 mM glucose and 1 mM Hepes-Tris, pH 7.3 (Glucose), or with the solution with which they were loaded (Control). For clarity, error bars are shown for every 50th experimental point.

FIGURE 10 Osmotic swelling of *M. sexta* and rabbit intestinal brush border membrane vesicles. (*A* and *B*) *M. sexta* or (*C* and *D*) rabbit brush border membrane vesicles were loaded with (*A* and *C*) 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3, or (*B* and *D*) 10 mM KSCN and 1 mM Hepes-Tris, pH 7.3, and mixed with an equal volume of (*A* and *C*) 150 mM KSCN and 10 mM Hepes-Tris, pH 7.3, (*B* and *D*) 160 mM KSCN and 1 mM Hepes-Tris, pH 7.3, or with the solution with which they were loaded (Control). The vesicle suspensions and solutions contained 7.5 μ M valinomycin (Val) or an equivalent concentration of ethanol (EtOH). For clarity, error bars are shown for every 50th experimental point.

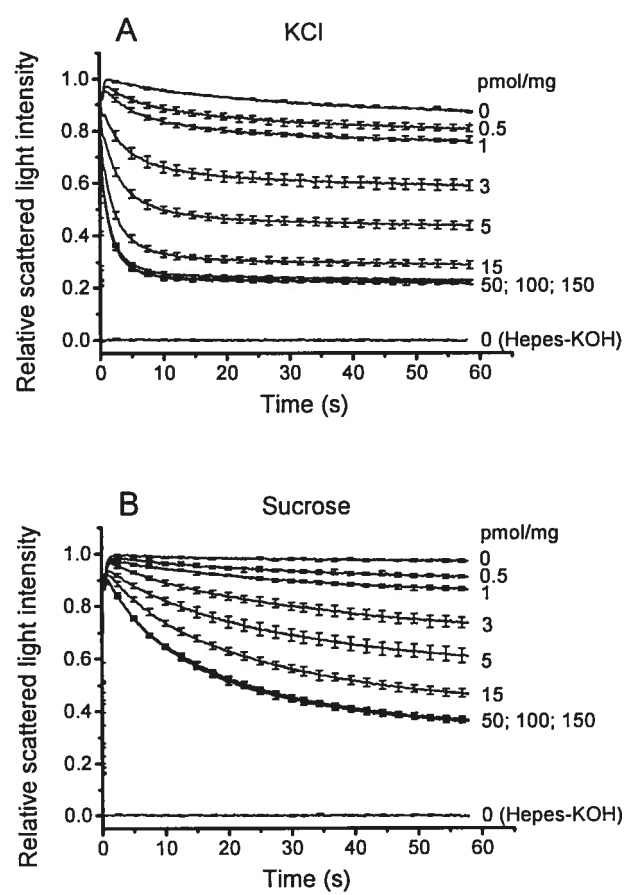
Figure 1

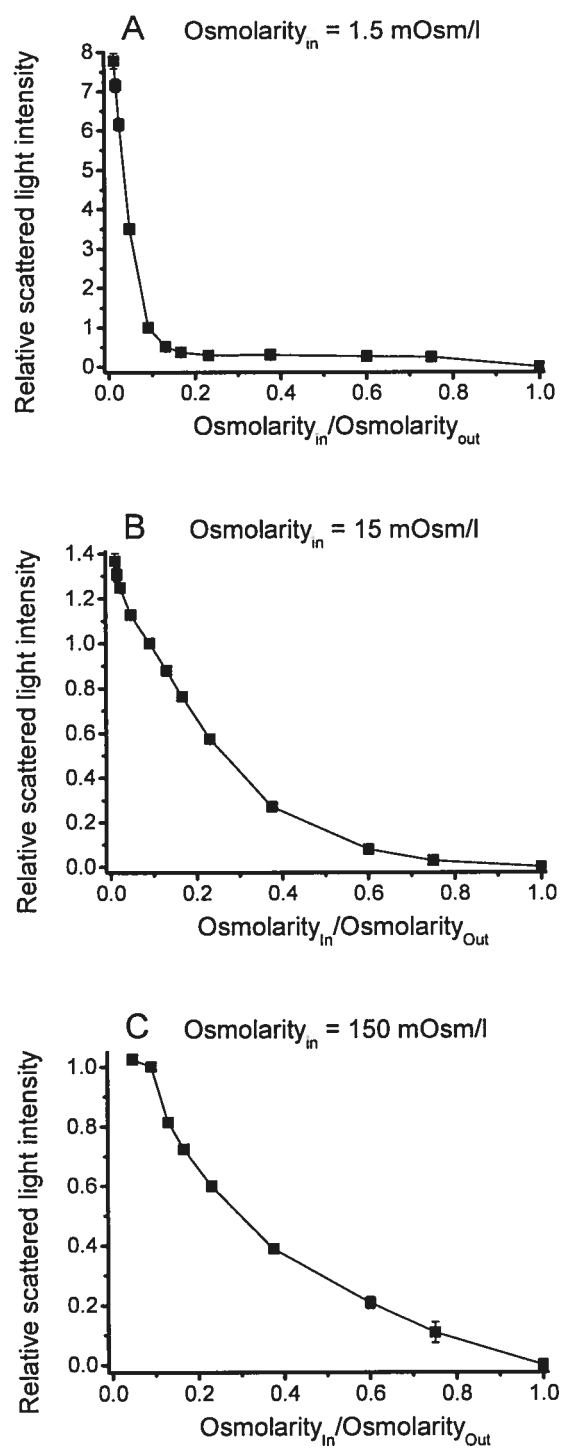
Figure 2

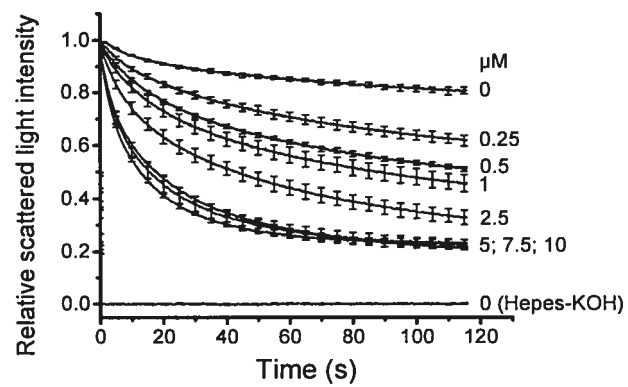
Figure 3

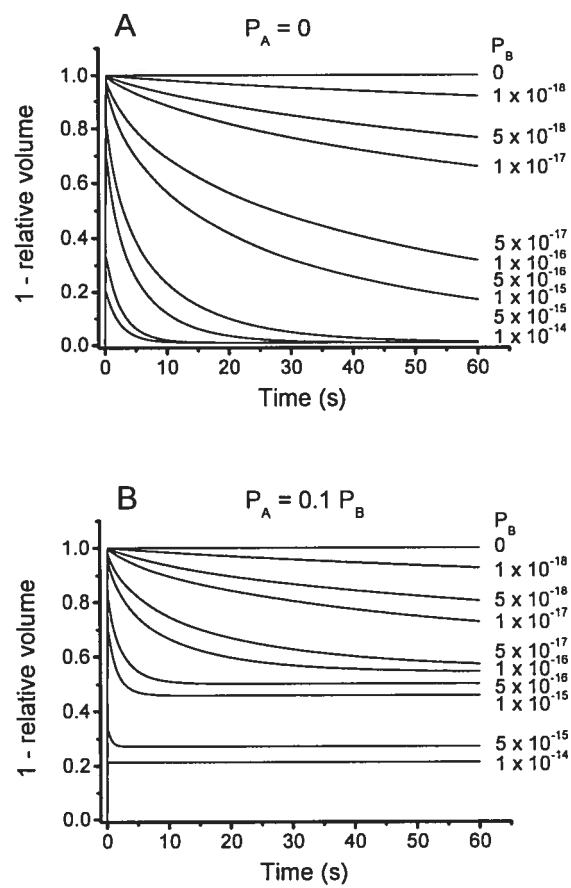
Figure 4

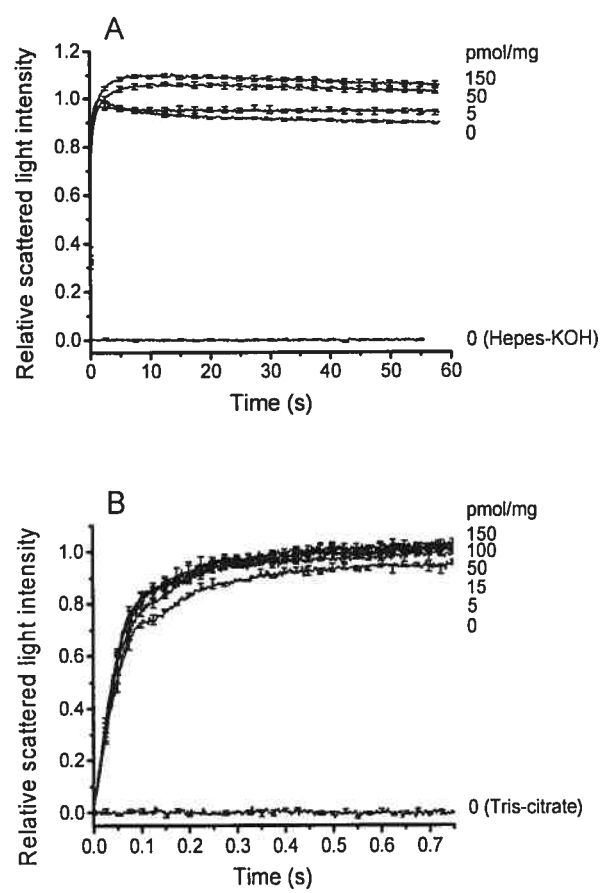
Figure 5

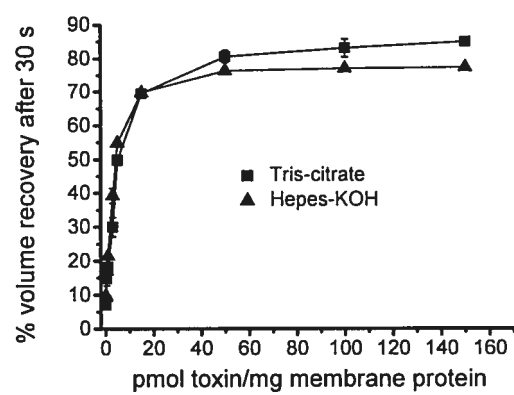
Figure 6

Figure 7

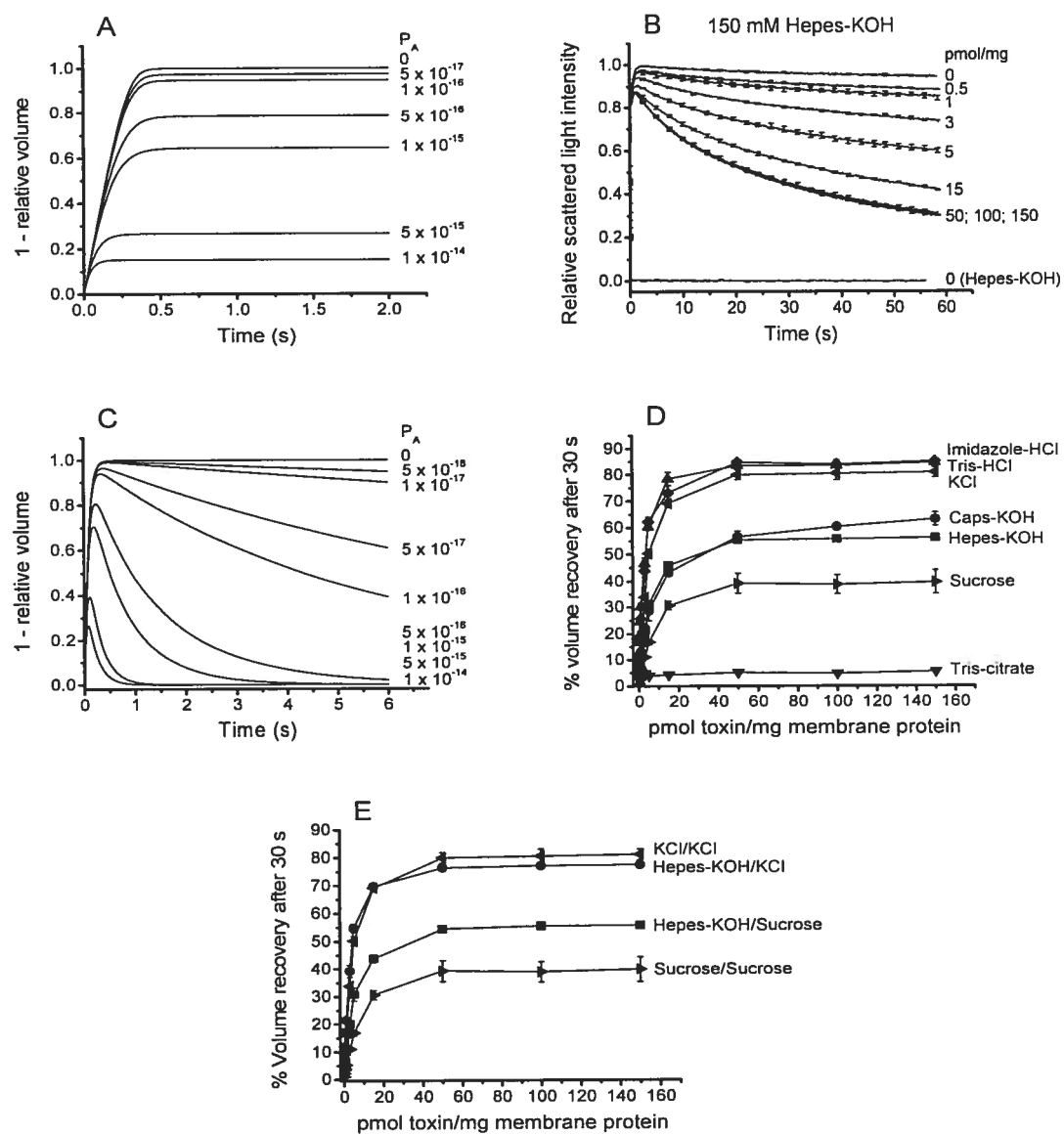


Figure 8

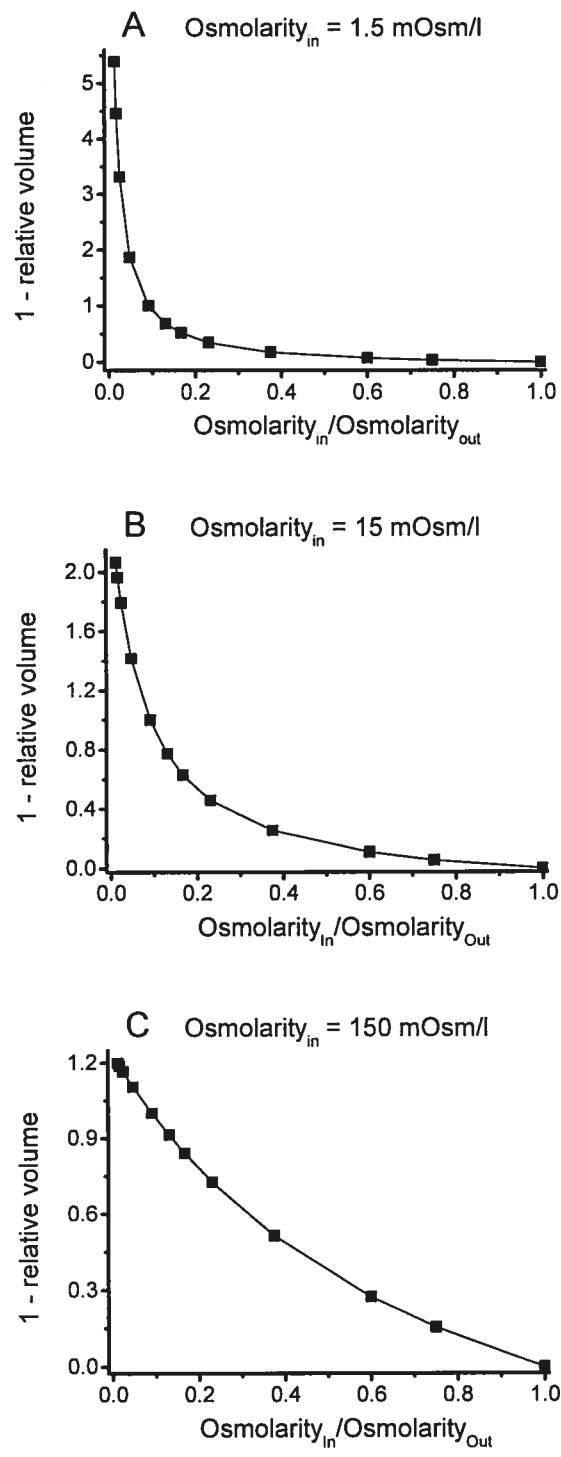


Figure 9

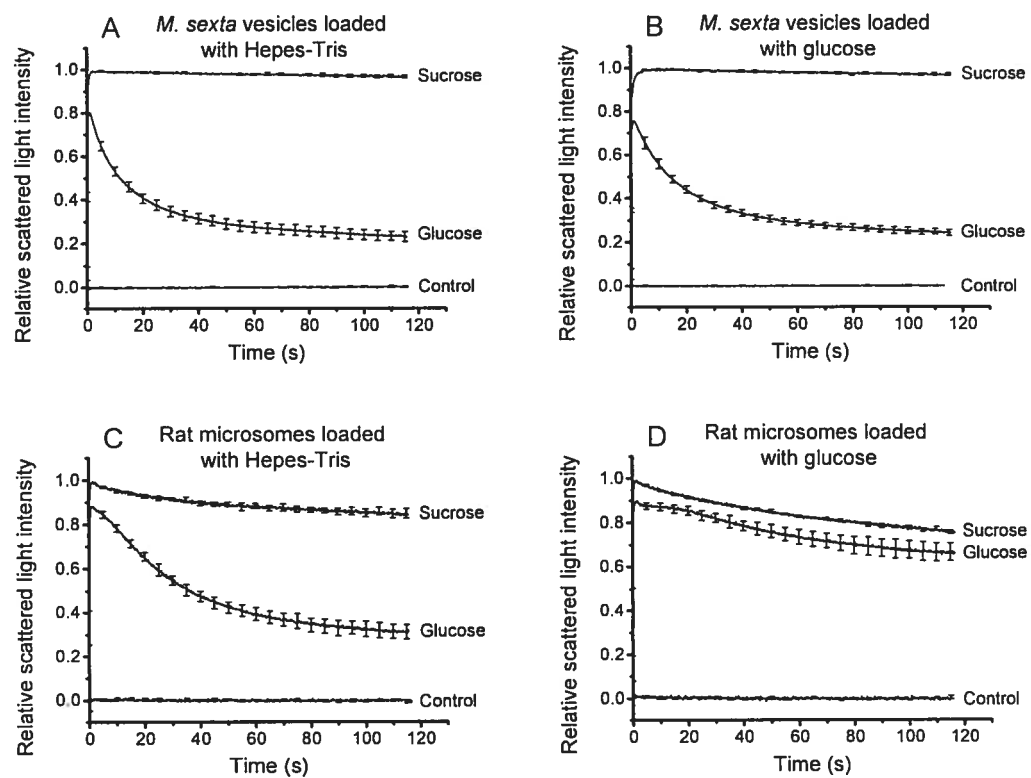
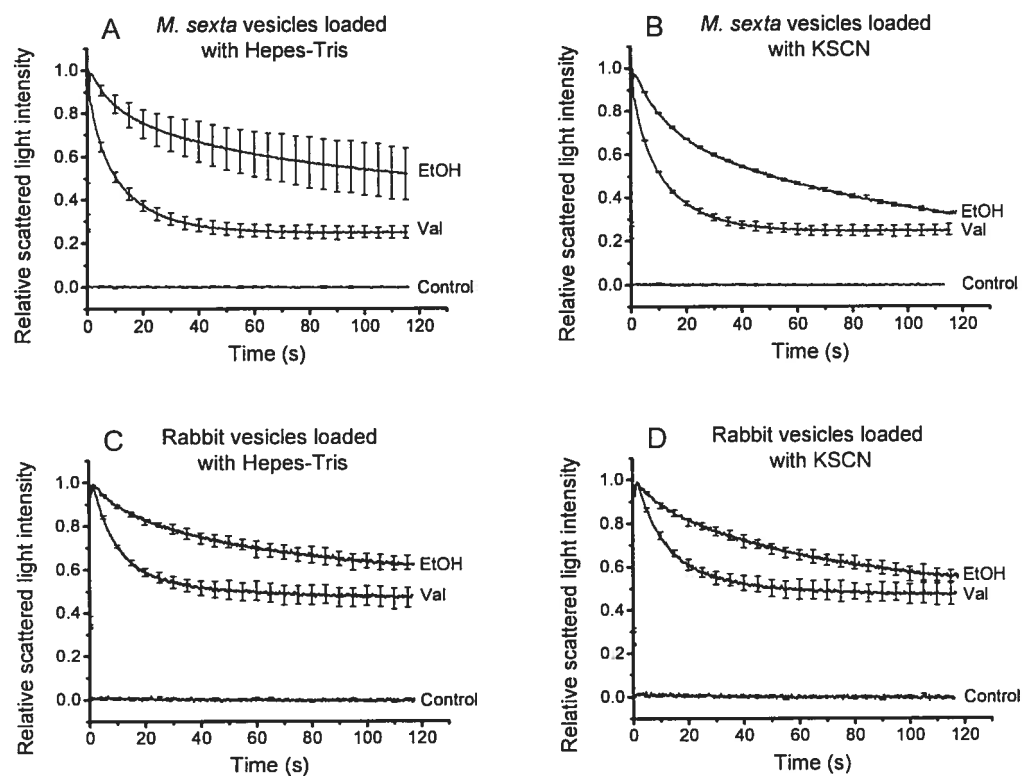


Figure 10



Accord des coauteurs

Identification de l'étudiant

Martin Kirouac

Ph.D. physique – biophysique et physiologie moléculaire

Description de l'article

Titre : A Mechanical Force Contributes to the "Osmotic Swelling" of Brush Border Membrane Vesicles

Auteurs : Martin Kirouac, Vincent Vachon, Mélanie Fortier, Marie-Claude Trudel, Alfred Berteloot, Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade

Revue : Biophysical Journal, sous presse.

Déclaration des coauteurs

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Martin Kirouac inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Effets des toxines insecticides du bacille de Thuringe sur la perméabilité des vésicules de membrane à bordure en brosse intestinale du sphinx du tabac ».

Vincent Vachon :

Date : 21 juin 2006

Mélanie Fortier :

Date : 21 juin 2006

Marie-Claude Trudel :

Date : 23 juin 2006

Alfred Berteloot :

Date : 20 juin 2006

Jean-Louis Schwartz :

Date : 21/06/2006

Raynald Laprade :

Date : 20/06/2006

Permission de l'éditeur**1. Identification de la revue**

Biophysical Journal
9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814

2. Identification de l'éditeur

Alisha Yocum
Editorial Office
9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814
Tél. : 301-634-7255
Fax : 301-634-7267
[REDACTED]

3. Identification de l'article

Titre : A Mechanical Force Contributes to the "Osmotic Swelling" of Brush
Border Membrane Vesicles
Auteurs : Martin Kirouac, Vincent Vachon, Mélanie Fortier, Marie-Claude Trudel,
Alfred Berteloot, Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade
Référence : Biophysical Journal, sous presse.

Permission granted [REDACTED]

Date

8/22/06

CHAPITRE 7

DISCUSSION GÉNÉRALE

Il est maintenant bien connu, qu'après avoir été activées par les protéases intestinales, les toxines insecticides de *B. thuringiensis* se fixent sur un récepteur spécifique et forment des pores dans la membrane apicale des cellules intestinales des insectes sensibles. Cependant, le mode d'action des toxines n'est pas encore complètement élucidé, notamment en ce qui concerne les étapes se produisant entre la fixation de la toxine sur la membrane et la formation du pore.

Classiquement, pour étudier l'activité d'une toxine, on effectue des tests *in vivo* dans lesquels la nourriture des chenilles est contaminée avec la toxine. Par ailleurs, plusieurs tests fonctionnels *in vitro* ont été adaptés à l'étude des mécanismes de formation des pores par les molécules de toxines. Parmi ceux-ci, on retrouve des techniques d'électrophysiologie permettant l'étude des courants ioniques générés par les pores formés par la toxine dans des bicouches lipidiques planes (Slatin *et al.*, 1990 ; Schwartz *et al.*, 1993) et l'étude des effets de la toxine sur le courant de court-circuit généré au travers d'un segment de l'épithélium intestinal (Harvey et Wolfersberger, 1979 ; Wolfersberger, 1995) et sur le potentiel membranaire des cellules épithéliales d'intestins isolés (Peyronnet *et al.*, 1997). De plus, il a récemment été montré qu'il est possible d'étudier la formation de pores dans les intestins isolés avec la technique de *patch clamp* (Peyronnet *et al.*, 2004). Plusieurs techniques optiques ont aussi été utilisées afin d'étudier la formation de pores dans la membrane de cellules en culture et dans des vésicules purifiées de la membrane à bordure en brosse de l'intestin moyen des lépidoptères. Entre autres, la formation de pores dans les cellules Sf9 a été étudiée avec des sondes fluorescentes sensibles au pH (Vachon *et al.*, 1995b), au potentiel membranaire (Guihard *et al.*, 2000) et aux concentrations de calcium (Monette *et al.*, 1997) et de potassium (Vachon *et al.*, 1995b ; Guihard *et al.*, 2000), et avec une technique de gonflement osmotique basée sur des mesures de vidéo-microscopie (Villalon *et al.*, 1998). D'autre part, les pores formés dans les vésicules de membrane à bordure en brosse ont été abondamment étudiés avec une technique de gonflement osmotique fondée sur des mesures de lumière diffusée (Carroll et Ellar, 1993) et avec

une technique utilisant une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire (Lorence *et al.*, 1995). Les techniques de gonflement osmotique, de fluorescence et d'électrophysiologie en intestins isolés ont l'avantage de permettre l'étude de l'activité des toxines sur leur cible naturelle. Cependant, contrairement aux techniques de fluorescence et de gonflement osmotique, la technique d'électrophysiologie en intestins isolés peut être utilisée pour étudier la formation de pores chez des insectes ayant de très petits intestins, comme le doryphore de la pomme terre, desquels il est très difficile de fabriquer des vésicules suffisamment étanches (M. Fortier, V. Vachon, L. Marceau, S. Rivest et R. Laprade, résultats non publiés). De plus, c'est le modèle *in vitro* le plus proche de la situation *in vivo*.

7.1. Sélectivité ionique des pores formés par les toxines

À la fin des années 1990, il semblait y avoir une contradiction à propos de la sélectivité ionique des pores formés par les toxines de *B. thuringiensis*. D'une part, il avait été montré que les pores formés dans les bicouches lipidiques planes en présence (Schwartz *et al.*, 1997b ; Lorence *et al.*, 1995) et en absence (Slatin *et al.*, 1990 ; Schwartz *et al.*, 1993, 1997b ; Peyronnet *et al.*, 2001) de récepteurs ont une sélectivité cationique. D'autre part, il avait aussi été montré que les pores formés dans les cellules en culture (Knowles et Ellar, 1987 ; Vachon *et al.*, 1995 ; Villalon *et al.*, 1998) et dans les vésicules de membrane à bordure en brosse (Hendrickx *et al.*, 1990 ; Carroll et Ellar, 1993, 1997) permettent la diffusion d'une variété de cations et d'anions monovalents et de plusieurs solutés neutres. Selon Schnepf *et al.* (1998) et Rajamohan *et al.* (1998), le fait qu'à pH 6.0 la Cry1Ca peut aussi former des pores sélectifs pour les anions dans les bicouches lipidiques planes (Schwartz *et al.*, 1993) suggère que l'apparente absence de sélectivité des pores formés dans les cellules en culture pourrait résulter de l'utilisation d'un pH près de la neutralité donc beaucoup moins élevé que celui retrouvé dans l'intestin moyen des lépidoptères. De plus, ces auteurs considèrent que les pores formés dans la membrane des cellules en culture ne représentent probablement pas ceux qui sont formés dans l'intestin de l'insecte puisque ces dernières ne sont pas la cible naturelle des toxines. Par contre, les travaux de Uemura *et al.* (1992) et de Lorence *et al.* (1995), utilisant avec une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire, suggèrent que

les toxines forment des pores cationiques dans les vésicules de membrane à bordure en brosse, malgré le fait qu'ils ont été réalisés à pH 7.5. Même si Schnepf *et al.* (1998) et Rajamohan *et al.* (1998) soutiennent que le pH joue un rôle majeur dans l'activité des toxines, il faut souligner que la majorité des études avaient jusqu'alors été réalisées à des pH près de la neutralité. Tran *et al.* (2001) ont donc entrepris une étude approfondie de l'effet du pH sur la formation des pores par la Cry1Ac et la Cry1Ca dans les vésicules de membrane à bordure en brosse avec la technique de gonflement osmotique. Alors que la Cry1Ac est peu influencée par le pH, la Cry1Ca est beaucoup moins active à pH 9.5 et 10.5 qu'entre pH 6.5 et 8.5. Les pores formés par la Cry1Ac entre pH 7.5 et 10.5 et ceux formés par la Cry1Ca entre pH 6.5 et 8.5 semblent peu sélectifs puisqu'ils permettent la diffusion du KCl, du chlorure de tétraméthylamonium, du gluconate de potassium et même du sucrose et du raffinose. Puisque la Cry1Ac a une activité similaire à pH 7.5 et 10.5, il n'y a pas nécessairement lieu de remettre en question les conclusions basées sur des expériences effectuées à un pH près de la neutralité. De plus, selon Tran *et al.* (2001), il ne semble pas que la diminution d'activité de la Cry1Ca à pH élevé soit due à un changement de sélectivité ionique des pores mais plutôt à la diminution du nombre de pores formés. Néanmoins, cette étude ne permet pas d'exclure complètement, tel que suggéré par Schwartz *et al.* (1993), que la sélectivité ionique des pores puisse être influencée par le pH. Par ailleurs, Whalon et Wingerd (2003) dans leur synthèse récente sur le mode d'action et l'utilisation des toxines du bacille de Thuringe continuent à promouvoir l'hypothèse selon laquelle les toxines forment des canaux ioniques sélectifs pour le potassium.

Nous avons donc tiré profit de la possibilité de modifier la charge nette des acides aminés en changeant le pH, sans modifier significativement la taille de ces derniers ni les propriétés des pores formés par la toxine, afin d'étudier la sélectivité ionique des pores formés par la Cry1Aa et la Cry1Ac dans des vésicules de membrane à bordure en brosse, purifiées de l'intestin moyen de *M. sexta*, avec la technique de gonflement osmotique (Chapitre 3) (Kirouac *et al.*, 2002). La perméabilité des pores pour les cations (Mg^{2+} , Ca^{2+} et Ba^{2+}) et anions (SO_4^{2-} et phosphate) divalents a aussi été étudiée. Les pores sont formés dans la cible naturelle des toxines en présence de tous les récepteurs pouvant potentiellement influencer leur activité. Les expériences ont été effectuées à pH

7.5 et 10.5 ; le nombre de charges négatives portées par les acides aminés et les ions phosphate augmente avec le pH. Nos résultats confirment que le pH a peu d'effet sur l'activité de ces toxines puisque les solutés dont la charge ne peut être modifiée par le pH (MgCl_2 , CaCl_2 , BaCl_2 et K_2SO_4) diffusent au travers de leurs pores aussi bien à pH 7.5 qu'à pH 10.5. Tous les acides aminés étudiés (Asp, Glu, Ser, Leu, His, Lys et Arg) diffusent au travers des pores formés par les deux toxines. La perméabilité pour tous les acides aminés, à l'exception de l'aspartate et du glutamate, est moins élevée à pH 10.5 qu'à pH 7.5. Ces deux acides aminés sont les seuls qui portent une charge nette négative à pH 7.5. La perméabilité des pores est plus grande pour les chlorures de cations divalents que pour les sels potassiques d'anions divalents. Ces résultats indiquent clairement que les pores formés par les toxines ont une sélectivité cationique.

La sélectivité cationique observée dans nos expériences de gonflement osmotique corrèle bien avec les potentiels d'inversion mesurés dans plusieurs études utilisant des bicouches lipidiques planes (Slatin *et al.*, 1990 ; Schwartz *et al.*, 1993 ; Lorence *et al.*, 1995 ; Schwartz *et al.*, 1997c). Ces potentiels d'inversion n'atteignent jamais le potentiel de Nernst pour le cation, en accord avec nos expériences de gonflement osmotique qui montrent hors de tout doute que la perméabilité pour les anions est loin d'être négligeable. De plus, contrairement aux suggestions de Crawford et Harvey (1988) et de Lorence *et al.* (1995), notre étude montre que les pores permettent la diffusion du baryum et du calcium, et aucun effet inhibiteur de ces ions n'a été observé. De plus, en accord avec nos résultats, les pores formés par la Cry1Ac dans les cellules en culture et dans les bicouches lipidiques planes sont perméables au calcium (Potvin *et al.*, 1998).

7.2. Étude de l'activité des toxines avec une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire

Dans de nombreux travaux, la formation des pores dans les vésicules a été étudiée à l'aide d'une technique utilisant une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire (le diS-C₃(5)) (Lorence *et al.*, 1995). Dans ces études, l'activité des toxines est estimée à partir de la comparaison, avec et sans toxine, de la pente des courbes obtenues en portant en graphique les changements de niveaux de fluorescence, suite à des ajouts séquentiels de KCl, en fonction du potentiel d'équilibre de Nernst pour le K⁺.

Ce calcul est basé sur la supposition que la membrane a une perméabilité négligeable, même en présence de toxine, pour tous les ions à l'exception du K^+ . Or, dans les expériences de gonflement osmotique, en présence d'un sel, un gonflement peut être détecté seulement si la membrane est perméable pour l'anion et pour le cation (Carroll et Ellar, 1993 ; Villalon *et al.*, 1998 ; Tran *et al.*, 2001 ; Kirouac *et al.*, 2002). Il ne semble donc pas justifié de négliger la perméabilité aux anions. De plus, les conclusions des expériences de fluorescence utilisant le protocole de Lorence *et al.* (1995) se basent sur la supposition que les changements de fluorescence sont exclusivement dus aux changements de potentiel membranaire. Or, il avait déjà été montré, au cours d'études très détaillées du mode d'action des sondes fluorescentes sensibles au potentiel membranaire, que d'autres facteurs, notamment la force ionique, influencent grandement ce type de mesures (Hladky et Rink, 1976 ; Waggoner, 1979 ; Wright, 1984). Enfin, les expériences de Lorence *et al.* (1995) montrent une dépolarisation immédiate des vésicules de membrane à bordure en brosse suite à l'ajout de toxine. Une activité instantanée de la toxine contredit de nombreux travaux notamment les expériences de gonflement osmotique dans lesquelles la toxine et les vésicules sont mélangées au moment du choc osmotique (Carroll et Ellar, 1993 ; Tran *et al.*, 2001) et dans lesquelles il faut attendre au moins 10 secondes avant de pouvoir détecter le début du gonflement des vésicules qui se poursuit ensuite pendant plusieurs minutes.

Notre étude du comportement de la sonde fluorescente sensible au potentiel dans les vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées de *M. sexta* (Chapitre 4) (Kirouac *et al.*, 2003) confirme que la force ionique et le pH des solutions exercent une influence majeure sur les mesures de fluorescence. Ces facteurs ont donc été gardés constants lors de l'étude de l'activité des toxines. Bien que les pores formés par la toxine augmentent considérablement la perméabilité de la membrane, ils ne modifient que très peu sa sélectivité ionique. D'ailleurs, en accord avec cette observation, mais en contradiction avec les conclusions tirées de leurs propres travaux utilisant la sonde fluorescente, Lorence *et al.* (1995) ont mesuré des potentiels d'inversion similaires pour les canaux endogènes des vésicules de membrane à bordure en brosse fusionnées avec des bicouches lipidiques planes et pour les pores formés par la toxine dans ces membranes. Par ailleurs, la sélectivité ionique de la membrane pour les ions potassiques peut être

considérablement augmentée par l'ajout de valinomycine, ce qui permet d'augmenter de façon importante le potentiel membranaire pouvant être généré dans les vésicules (Chapitre 4) (Kirouac *et al.*, 2003). En présence de valinomycine, à pH 7.5 et 10.5, la Cry1Aa, la Cry1Ab, la Cry1Ac, la Cry1Ca et la Cry1Ea, toutes toxiques envers *M. sexta*, dépolarisent efficacement la membrane alors que la Cry1Ba, qui n'est pas toxique, n'a pas d'effet. Les toxines actives dépolarisent la membrane en permettant la diffusion des ions K^+ , TMA^+ , $NMDG^+$ et Cl^- . Nos travaux ont ainsi permis la mise au point d'une technique rigoureuse et fiable afin de détecter l'activité des toxines avec la sonde fluorescente. Cette technique requiert une moins grande quantité de vésicules et de toxine que la technique de gonflement osmotique et elle se prête aussi à l'étude de d'autres protéines qui perméabilisent les membranes. Par exemple, elle est présentement utilisée pour l'étude de la perméabilisation par l'entérotoxine STb (produite par *E. coli*) de vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées de l'intestin du porc (C. Gonçalves, V. Vachon, J.-L. Schwartz et J.D. Dubreuil, communication personnelle).

Cependant, on observe un manque de corrélation entre les résultats des expériences de gonflement osmotique qui montrent une diminution considérable de l'activité de la Cry1Ca à pH élevé (Tran *et al.*, 2001) et ceux des expériences de fluorescence qui montrent plutôt le contraire (Chapitre 4) (Kirouac *et al.*, 2003). Ceci suggère que la force ionique des solutions lors de la formation des pores, principale différence entre les deux techniques, pourrait jouer un rôle important. Nous avons donc étudié l'effet de la force ionique et du pH sur l'activité de la Cry1Ac et de la Cry1Ca chez *M. sexta* avec la technique d'électrophysiologie en intestins isolés et avec la technique de gonflement osmotique (Fortier *et al.*, 2005). Ces expériences ont montré que l'effet de la force ionique est beaucoup plus marqué à pH 10.5 qu'à pH 7.5. À pH 10.5, une diminution de la force ionique augmente l'activité de la Cry1Ac et diminue celle de la Cry1Ca, permettant ainsi de réconcilier les résultats obtenus avec la technique de gonflement osmotique (Tran *et al.*, 2001) avec ceux obtenus avec la sonde fluorescente (Chapitre 4) (Kirouac *et al.*, 2003). Tout comme l'augmentation de la force ionique, à pH élevé, l'ajout de calcium augmente l'activité de la Cry1Ca et diminue celle de la Cry1Ac (Fortier *et al.*, 2005), ce qui démontre l'importance des interactions électrostatiques dans le processus de formation des pores.

L'effet des toxines sur le potentiel membranaire mesuré en présence de valinomycine dans les expériences de fluorescence (Chapitre 4) (Kirouac *et al.*, 2003) est, de façon qualitative, en accord avec leur toxicité envers les chenilles de *M. sexta*. Cependant, même à pH 10.5 et à force ionique élevée, conditions retrouvées *in vivo*, les mesures ne rendent pas compte du fait que les concentrations pour obtenir 50% de mortalité sont de 4 à 12 fois plus élevées pour la Cry1Ca et la Cry1Ea que pour la Cry1Aa, la Cry1Ab et la Cry1Ac (Höfte *et al.*, 1988 ; Van Rie *et al.*, 1989, 1990). Plusieurs autres cas ont été décrits où des toxines forment efficacement des pores dans des vésicules de membrane à bordure en brosse (Luo *et al.*, 1999a ; Coux *et al.*, 2001 ; Vachon *et al.*, 2002), dans des intestins isolés (Peyronnet *et al.*, 1997) et dans des cellules épithéliales dissociées (Masson *et al.*, 1994) malgré une toxicité modeste envers les larves des espèces correspondantes. En plus du pH, de la force ionique et des ions divalents, d'autres facteurs présents dans l'intestin de l'insecte semblent donc influencer l'activité des toxines.

7.3. Influence des protéases intestinales sur l'activité des toxines

Les protéases de l'intestin moyen sont responsables de l'activation de la protoxine. La susceptibilité des toxines à une protéolyse supplémentaire dans l'intestin pourrait cependant expliquer, du moins en partie, le manque de corrélation parfois observé entre leur activité *in vivo* et *in vitro* (Masson *et al.*, 1994 ; Peyronnet *et al.*, 1997 ; Coux *et al.*, 2001 ; Vachon *et al.*, 2002). Par exemple, la Cry1Ca peut être complètement dégradée lorsqu'elle est incubée avec le suc intestinal provenant de larves de *Spodoptera littoralis* des derniers stades (Keller *et al.*, 1996) et plusieurs études *in vitro* ont identifié des sites de protéolyse à l'intérieur de la toxine activée (Chapitre 5) (Kirouac *et al.*, 2006b). Des études récentes suggèrent que, suite à la fixation au récepteur, la toxine activée pourrait subir une protéolyse supplémentaire qui contribuerait à la formation de pores. Lightwood *et al.* (2000) ont suggéré qu'une protéolyse à l'intérieur du domaine I pourrait faciliter l'insertion de la toxine dans la membrane. Selon Gómez *et al.* (2002), la liaison de la Cry1Ab au récepteur Bt-R1 de type cadhérine permet la coupure de l'hélice $\alpha 1$, ce qui permet l'oligomérisation des molécules de toxine et la formation d'un « pré-pore » capable de s'insérer dans la membrane. Ces auteurs ont proposé que cette coupure

pourrait être essentielle à la formation des pores. Puisque les toxines forment efficacement des pores dans les vésicules de membrane à bordure en brosse sans l'ajout de protéases solubles, si une telle protéolyse était essentielle elle devrait pouvoir être effectuée par les protéases membranaires. Cependant, cette hypothèse se fonde sur des mesures de fluorescence effectuées avec la technique de Lorence *et al.* (1995) qui a déjà été remise en question (Chapitre 4) (Kirouac *et al.*, 2003). De plus, il n'est pas certain que l'activité des protéases membranaires soit parfaitement conservée suite à la fabrication et à la congélation des vésicules.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les protéases membranaires pourraient jouer un rôle dans le mode d'action des toxines, l'activité de la Cry1Aa a été étudiée avec la technique de gonflement osmotique en présence d'une variété d'inhibiteurs de protéases (Chapitre 5) (Kirouac *et al.*, 2006b). Dans ces expériences, les seules protéases présentes sont celles qui sont situées à la surface de la membrane des vésicules. Nous avons choisi des inhibiteurs couramment utilisés pour inhiber chaque famille de protéases. Puisque les principales protéases présentes dans l'intestin moyen des lépidoptères sont des protéases à sérine (Terra et Ferreira, 1994), principalement des trypsines et des chymotrypsines, plusieurs inhibiteurs de ce type de protéases ont été utilisés. La très grande majorité des inhibiteurs testés n'ont pas d'effet sur l'activité de la Cry1Aa.

Par contre, à forte concentration, le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), un inhibiteur de protéases à sérines, augmente la vitesse de formation des pores. Cet inhibiteur ne semble toutefois pas modifier les propriétés de pores formés. Puisque les autres inhibiteurs de protéases à sérine testés, notamment le fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyl (AEBSF), un autre inhibiteur de type fluorure de sulfonyl, n'ont pas d'effet, il ne semble pas que le PMSF agisse en inhibant une protéase membranaire qui pourrait empêcher la formation de pores en dégradant les molécules de toxine. Le PMSF agit probablement en modifiant un résidu sérine (Gold, 1965) qui devient accessible seulement après la liaison de la toxine au récepteur. Cette modification pourrait augmenter l'activité de la toxine en y ajoutant un ou plusieurs groupements hydrophobes, ce qui faciliterait son insertion dans la membrane. Le PMSF augmente aussi la vitesse de formation de pores par la Cry1Ab, la Cry1Ac, la Cry1Ca et

la Cry1Ea. Le fait que le PMSF agisse seulement lorsque ajouté simultanément avec la toxine et les vésicules indique qu'il modifie probablement la toxine à un endroit inaccessible en milieu aqueux mais qui devient accessible lors du changement de conformation conduisant à la formation du pore. Ceci complique son utilisation éventuelle comme additif aux préparations commerciales de *B. thuringiensis* car il pourrait aussi inhiber les protéases qui sont essentielles à l'activation des toxines. De plus, le PMSF est relativement toxique et instable en milieux aqueux (James, 1978 ; Salvesen et Nagase, 1989).

D'autre part, l'EDTA et l'EGTA, deux chélateurs d'ions divalents qui sont des inhibiteurs de métalloprotéases, réduisent la vitesse de formation des pores à pH 10.5, mais seul l'EDTA a un effet inhibiteur à pH 7.5. À pH 10.5, l'EDTA inhibe aussi l'activité de la Cry1Ab, la Cry1Ac et la Cry1Ea mais n'a pas d'effet sur la Cry1Ca. L'effet de l'EGTA et de l'EDTA ne semble pas relié à une activité protéolytique qui pourrait être essentielle à la formation des pores puisque ces chélateurs n'inhibent jamais complètement la formation de pores et dans certaines conditions ils n'ont pas d'effets. De plus, l'*o*-phénanthroline, un inhibiteur de métalloprotéases qui a une constante d'affinité beaucoup plus grande pour les métaux lourds (cofacteurs essentiels pour l'activité des métalloprotéases) que pour le calcium et les autres cations du groupe des alcalino-terreux (Salvesen et Nagase, 1989), n'a pas d'effet. L'influence de l'EDTA peut aussi être inversée de façon non spécifique par l'ajout d'un excès de calcium, de baryum ou de magnésium. L'effet de l'EGTA et de l'EDTA semble donc plutôt indiquer que des cations divalents pourraient intervenir ailleurs dans le mécanisme de formation des pores. Une inhibition par l'EDTA de la formation des pores par la Cry1Ac à pH élevé a aussi été démontrée par Fortier *et al.* (2005). L'étude de l'influence des inhibiteurs de protéases sur la formation de pores par la Cry1Aa activée avec la trypsine montre donc que cette toxine est complètement fonctionnelle en l'absence de toute protéolyse supplémentaire.

7.4. Modèle séquentiel de formation des pores

Sur la base des travaux de Zhuang *et al.* (2002) et de Gómez *et al.* (2002), Bravo *et al.* (2004) ont proposé le mode d'action suivant pour les toxines insecticides Cry de *B. thuringiensis*. Suite à la solubilisation du cristal et à l'activation des protoxines par les protéases intestinales, la toxine se fixe d'abord au récepteur de type cadhérine, ce qui, comme mentionné dans la section précédente, induirait la coupure de l'hélice $\alpha 1$ par une protéase membranaire. Cette coupure favoriserait l'oligomérisation des molécules de toxine et la formation du pré-pore qui se lierait ensuite à l'aminopeptidase N, fixée par une ancre GPI dans les radeaux lipidiques, puis s'insérerait dans la membrane. Il ne semble cependant pas que la coupure de l'hélice $\alpha 1$ soit essentielle pour l'activité des toxines (Chapitre 5) (Kirouac *et al.*, 2006b). Il ne peut toutefois pas être exclu qu'une protéolyse supplémentaire à l'intérieur du domaine I suite à la fixation de la toxine sur le récepteur puisse stimuler l'activité de la toxine (Lightwood *et al.*, 2000). Par contre, comme nous l'avons montré, cette protéolyse ne semble pas pouvoir être effectuée par les protéases membranaires de la membrane à bordure en brosse, du moins pas dans des vésicules isolées (Chapitre 5) (Kirouac *et al.*, 2006b). De plus, l'hypothèse selon laquelle la toxine se fixe d'abord à la cadhérine puis à l'aminopeptidase N se base exclusivement sur des expériences d'immunoprécipitation (Bravo *et al.*, 2004) et aucune étude fonctionnelle validant cette hypothèse n'a été réalisée.

7.5. Cinétique de gonflement osmotique des vésicules

Dans les expériences de gonflement osmotique, à la suite du choc hypertonique, en présence de toxine, les vésicules de membrane à bordure en brosse ne regonflent pas jusqu'à leur volume initial mais jusqu'à un volume qui dépend de la perméabilité de la membrane et de la concentration de toxine (Chapitres 3, 5, 6) (Kirouac *et al.*, 2002, 2006a,b). Des simulations numériques ont suggéré que ceci pourrait s'expliquer par une fuite de tampon des vésicules lors du rétrécissement (Chapitre 6) (Kirouac *et al.*, 2006a). Or, les résultats expérimentaux montrent que ce n'est clairement pas le cas puisque la cinétique de gonflement demeure inchangée lorsque les vésicules sont chargées avec un tampon qui n'est pas perméant au travers des pores formés par la toxine. Lorsque le choc hypertonique est effectué avec le soluté avec lequel les vésicules ont été chargées, les

simulations prédisent que les vésicules vont rétrécir et atteindre un volume constant qui dépend de la perméabilité de la membrane pour le soluté. Cependant, dans ces conditions, un gonflement est quand même observé. Une force mécanique semble donc contribuer au gonflement des vésicules. Cette force peut être modélisée comme celle d'un ressort comprimé par le rétrécissement. Elle peut expliquer la non linéarité des courbes de calibrage entre l'intensité de la lumière diffusée et le volume des vésicules de même que le gonflement observé lorsque le choc osmotique est effectué avec le soluté avec lequel les vésicules ont été chargées. Cette force est aussi présente dans des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées du jéjunum de lapin mais semble beaucoup moins importante dans des microsomes purifiés du foie de rat. Le cytosquelette, présent dans les vésicules de membrane à bordure en brosse mais absent des microsomes, pourrait donc être à l'origine de cette force mécanique. Cette force ne remet cependant pas en question l'interprétation des résultats des études utilisant la technique de gonflement osmotique qui a été utilisée pour détecter la formation des pores puisque, peu importe son origine, il y a regonflement seulement lorsque la membrane des vésicules est perméable au soluté externe et la vitesse de gonflement dépend de la perméabilité de la membrane.

Un regonflement des vésicules lorsque le même soluté est présent à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules a déjà été observé. Les vésicules de membrane à bordure en brosse de rein chargées avec du mannitol regonflent suivant un choc osmotique de mannitol (Soveral *et al.*, 1997). Contrairement à nos expériences, ce gonflement est très lent et peut prendre jusqu'à 10 heures. Soveral *et al.* (1997) ont proposé que, suite au choc osmotique, il pourrait rester un gradient chimique de mannitol dû à une pression hydrostatique causée par des molécules osmotiquement actives à l'intérieur des vésicules. Cette pression hydrostatique pourrait jouer un rôle similaire à la force mécanique que nous avons simulée. Cependant, dans nos expériences l'amplitude d'une telle force hydrostatique devrait être très petite car on s'attend à ce que des molécules osmotiquement actives présentes à l'intérieur des vésicules puissent diffuser au travers des pores formés par la toxine lors de l'incubation des vésicules avant le choc osmotique et pendant la phase de rétrécissement accompagnant le choc osmotique.

CHAPITRE 8

PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

8.1. Étude de l'importance relative des différents récepteurs dans le mode d'action des toxines

Tel que mentionné dans la section 7.4., selon le mode d'action proposé pour les toxines Cry par Bravo *et al.* (2004), la toxine activée se fixerait d'abord au récepteur de type cadhérine, ce qui induirait la formation d'un pré-pore. La fixation subséquente de cette structure à l'aminopeptidase N permettrait son insertion dans la membrane et la formation d'un pore. L'importance de l'aminopeptidase N comme récepteur peut être étudiée en incubant les vésicules de membrane à bordure en brosse avec la phospholipase C (Lorence *et al.*, 1997) qui coupe l'ancre GPI fixant cette enzyme à la membrane. Cependant, ce traitement ne fait que réduire la proportion entre l'aminopeptidase N et les autres récepteurs car l'activité enzymatique de l'aminopeptidase N est toujours détectable suite au traitement (Lorence *et al.*, 1997). Par contre, étant donné que les récepteurs aminopeptidase N (Sangadala *et al.*, 1994 ; Schwartz *et al.*, 1997b) et cadhérine (Vadlamudi *et al.*, 1993) de *M. sexta* ont déjà été purifiés, afin de déterminer leur importance relative, ces récepteurs pourraient être reconstitués, individuellement et en même temps, dans des liposomes formés des lipides extraits de la membrane à bordure en brosse de l'intestin moyen de cet insecte. Afin de purifier les récepteurs, les protéines membranaires doivent préalablement être extraites des membranes à l'aide de détergents ; une centrifugation différentielle permet ensuite de se débarrasser de la fraction qui n'est pas soluble. Schwartz *et al.* (1997b) ont obtenu une préparation enrichie d'aminopeptidase N de 120 kDa en fractionnant les protéines des vésicules de membrane à bordure en brosse par filtration sur gel en utilisant une colonne de type Sephacryl S-300. Vadlamudi *et al.* (1993) ont purifié le récepteur cadhérine de 210 kDa par immunoprécipitation en ajoutant le complexe protéine A-sépharose-anti-Cry1Ab aux protéines membranaires solubilisées. L'extraction des lipides de la membrane à bordure en brosse de l'intestin moyen de *M. sexta* peut être effectuée à partir des vésicules avec la technique largement utilisée de Kates (1986) basée sur celle mise au point par Bligh et Dyer (1959). La formation de

pores par les toxines Cry1 dans les liposomes, notamment par la Cry1Aa et la Cry1Ab, pourrait être étudiée avec la sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire (Chapitre 4) (Kirouac *et al.*, 2003). D'ailleurs, une technique similaire a déjà été utilisée pour étudier la formation de pores par la Cry1Ca dans des liposomes formés de phosphatidylcholine (Butko *et al.*, 1994). Bien que ces travaux représentent un travail considérable, les techniques nécessaires ont déjà toutes été mises au point et sont, du moins en partie, déjà bien maîtrisées par notre équipe.

De plus, même s'il a été suggéré que certains glycolipides pourraient servir de récepteurs pour les toxines de *B. thuringiensis* (Garczynski et Adang, 2000 ; Griffiths *et al.*, 2005), l'influence de la composition lipidique sur l'activité des toxines n'a jamais été directement étudiée et peu d'études portent sur la composition lipidique de l'intestin moyen des lépidoptères (Leonardi *et al.*, 2001 ; Sangadala *et al.*, 2001 ; Zhuang *et al.*, 2002). Afin d'étudier l'influence de la composition lipidique de la membrane sur l'activité des toxines, leur capacité à former des pores dans des liposomes constitués de divers types de lipides pourrait être comparée, notamment en utilisant des liposomes constitués d'azolectine, un mélange de lipides pouvant former des liposomes de bonne qualité, ou de lipides extraits de la membrane à bordure en brosse de l'intestin moyen. Des glycolipides pourraient aussi être incorporés à l'azolectine. Finalement, la formation de pores dans des liposomes constitués d'un mélange de phosphatidyléthanolamine et de phosphatidylcholine, correspondant à la composition lipidique utilisée dans plusieurs études de bicouches lipidiques planes (Peyronnet *et al.*, 2001, 2002), pourrait aussi être étudiée. Notons que l'étude de la composition lipidique de l'intestin moyen de *M. sexta* serait aussi très pertinente, d'autant plus que la physiologie intestinale de ce lépidoptère a beaucoup été étudiée. Pour ce faire, l'extrait de lipides devrait d'abord être fractionné par chromatographie sur colonne, afin de séparer les grandes classes de lipides, puis par chromatographie sur couche mince. Par la suite, les acides gras convertis sous forme de méthyle esters pourraient être analysés par chromatographie en phase gazeuse (Kates, 1986).

D'autre part, Zhuang *et al.* (2002) ont étudié le rôle des radeaux lipidiques sur la formation de pores par la Cry1Ab dans des vésicules de membrane à bordure en brosse en utilisant la méthyle- β -cyclodextrine, un agent qui séquestre le cholestérol et

déstabilise les radeaux lipidiques. La formation de pores a ensuite été étudiée sur ces vésicules avec la technique utilisant la sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire (Lorence *et al.*, 1995) que nous avons remise en question (Chapitre 4) (Kirouac *et al.*, 2003). La formation de pores dans ces conditions devrait donc être étudiée à nouveau avec la technique de fluorescence que nous avons développée et avec la technique de gonflement osmotique. Les lipides constituant les radeaux lipidiques (c'est-à-dire les domaines membranaires résistants, à basse température, au Triton X-100) pourraient aussi être incorporés aux liposomes d'azolectine.

8.2. Force mécanique à l'origine du gonflement des vésicules de membrane à bordure en brosse

Afin d'étudier l'origine de la force mécanique qui contribue au regonflement des vésicules de membrane à bordure en brosse dans les expériences de gonflement osmotique (Chapitre 6) (Kirouac *et al.*, 2006), des expériences tentant de déstabiliser le cytosquelette des vésicules pourraient être effectuées. Le diiodosalicylate de lithium et le thiocyanate de sodium sont des sels chaotropiques qui ont déjà été utilisés avec succès afin d'extraire certaines protéines du cytosquelette de la membrane à bordure en brosse des mammifères (Hopfer *et al.*, 1983 ; Riendeau *et al.*, 1986). L'utilisation des techniques employées pour les membranes de mammifères n'a cependant pas permis d'extraire des protéines du cytosquelette de la membrane à bordure en brosse de diptères, de coléoptères ou de lépidoptères (Jordão *et al.*, 1995 ; Capella *et al.*, 1997). Par contre une technique utilisant un choc hyperosmotique de Tris a réussi à extraire les protéines du cytosquelette de ces insectes (Jordão *et al.*, 1995 ; Capella *et al.*, 1997). Aucune étude n'a cependant été effectuée avec *M. sexta*. La cinétique de gonflement de vésicules de *M. sexta* traitées avec le thiocyanate de sodium (Hopfer *et al.*, 1983) et avec le Tris (Jordão *et al.*, 1995) demeure inchangée alors que les vésicules traitées avec le diiodosalicylate de lithium (Riendeau *et al.*, 1986) ne sont plus osmotiquement étanches (M. Kirouac, V. Vachon, M. Fortier et R. Laprade, résultats non publiés). Il semble donc que les conditions déjà utilisées pour d'autres membranes soient ou trop douces pour déstabiliser le cytosquelette de *M. sexta* ou trop sévères pour la conservation de l'étanchéité des vésicules.

Dans un premier temps, la cinétique de gonflement des vésicules de mammifères traitées au diiodosalicylate de lithium et au thiocyanate de sodium pourrait être étudiée avec la technique de gonflement osmotique afin de déterminer si le cytosquelette est responsable de la force mécanique de gonflement. On pourrait ensuite adapter les conditions de Jordão *et al.* (1995) et de Capella *et al.* (1997) afin d'extraire les protéines du cytosquelette des vésicules de *M. sexta*. Suite au traitement, une centrifugation à haute vitesse permet de récupérer les vésicules dans le culot et les protéines extraites dans le surnageant. Les vésicules sont ensuite remises en suspension puis dosées ; une augmentation de l'activité spécifique de marqueurs de la membrane à bordure en brosse (rapport entre l'activité enzymatique de marqueurs spécifiques et la concentration de protéine de la suspension) indique que le traitement a bel et bien permis l'extraction de protéines. Une extraction préférentielle de protéines ayant un faible poids moléculaire suggère que ce sont des protéines du cytosquelette qui ont été extraites (Maroux *et al.*, 1988).

8.3. Conclusions

Une fois activées, les toxines du bacille de Thuringe sont complètement fonctionnelles et forment des pores ayant une sélectivité cationique dans la membrane apicale des cellules épithéliales des insectes sensibles. Les pores formés dans ces membranes permettent aussi la diffusion de solutés neutres et chargés négativement. Nous disposons maintenant de plusieurs techniques *in vitro* permettant d'étudier l'activité des toxines dans la membrane épithéliale des insectes. Ces techniques ont permis de montrer que la force ionique, le pH et les ions divalents influencent l'activité des toxines. D'autres facteurs présents dans l'intestin des insectes, notamment les protéases solubles, influencent probablement aussi l'activité des toxines, ce qui pourrait expliquer les différences d'activité parfois observées entre les tests *in vitro* et les toxicités *in vivo*.

Les travaux suggérés visant à déstabiliser le cytosquelette des vésicules de membrane à bordure en brosse devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes responsables du gonflement des vésicules dans les expériences de gonflement osmotique. Cette technique, qui a beaucoup été utilisée, demeure une

méthode de choix non seulement pour l'étude des toxines du bacille de Thuringe, mais aussi pour l'étude de la perméabilité des membranes en général. Conjointement avec les travaux déjà en cours au sein de notre laboratoire, les expériences suggérées afin de déterminer le rôle des récepteurs devraient permettre de mieux comprendre le mode d'action de ces toxines insecticides qui présentent un très grand intérêt, non seulement du point de vue de la biophysique fondamentale, mais également du point de vue économique et écologique.

RÉFÉRENCES

- Adang, M.J. et Spence, K.D. (1981)** Surface morphology of peritrophic membrane formation in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Cell Tissue Res.* **218**:141–147.
- Ahmad, W. et Ellar, D.J. (1990)** Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**:97–104.
- Akiba, T., Higuchi, K., Mizuki, E., Ekino, K., Shin, T., Ohba, M., Kanai, R. et Harata, K. (2006)** Nontoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* demonstrates a remarkable structural similarity to β -pore-forming toxins. *Proteins* **63**:243–248.
- Andrews, R.E., Jr., Bibilos, M.M. et Bulla, L.A., Jr. (1985)** Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:737–742.
- Angus, T.A. (1956a)** Association of toxicity with protein crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. *Can. J. Microbiol.* **2**:122–131.
- Angus, T.A. (1956b)** Extraction, purification, and properties of *Bacillus sotto* toxin. *Can. J. Microbiol.* **2**:416–426.
- Arnold, S., Curtiss, A., Dean, D.H. et Alzate, O. (2001)** The role of a proline-induced broken-helix motif in α -helix 2 of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *FEBS Lett.* **490**:70–74.
- Aronson, A. (2000)** Incorporation of protease K into larval insect membrane vesicles does not result in disruption of integrity or function of the pore-forming *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4568–4570.
- Aronson, A.I., Geng, C. et Wu, L. (1999)** Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2503–2507.
- Aronson A.I. et Shai Y. (2001)** Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:1–8.
- Aronson, A.I., Wu, D. et Zhang, C. (1995)** Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* **177**:4059–4065.

- Azuma, M., Harvey, W.R. et Wieczorek, H. (1995)** Stoichiometry of K^+/H^+ antiport helps to explain extracellular pH 11 in a model epithelium. *FEBS Lett.* **361**:153–156.
- Bah, A., van Frankenhuyzen, K., Brousseau, R. et Masson L. (2004)** The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *J. Invertebr. Pathol.* **85**:120–127.
- Banks, D.J., Hua, G. et Adang, M.J. (2003)** Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**:499–508.
- Banks, D.J., Jurat-Fuentes, J.L., Dean, D.H. et Adang, M.J. (2001)** *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa δ -endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in *Heliothis virescens* is not N-acetylgalactosamine mediated. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**:909–918.
- Barbehenn, R.V. et Martin, M.M. (1995)** Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. *J. Insect. Physiol.* **41**:303–311.
- Bietlot, H., Carey, P.R., Choma, C., Kaplan, H., Lessard, T. et Pozsgay, M. (1989)** Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochem. J.* **260**:87–91.
- Bietlot, H.P.L., Vishnubhatla, I., Carey, P.R., Pozsgay, M. et Kaplan, H. (1990)** Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J.* **267**:309–315.
- Biggin, P.C. et Sansom, M.S.P. (1996)** Simulation of voltage-dependent interactions of α -helical peptides with lipid bilayers. *Biophys. Chem.* **60**:99–110.
- Bligh, E.G. et Dyer, W.J. (1959)** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911–917.
- Boisvert, J. et Lacoursière, J.O. (2004)** *Le Bacillus thuringiensis israelensis et le contrôle des insectes piqueurs au Québec*. Document préparé par l'Université du Québec à Trois-Rivières pour le Ministère de l'environnement du Québec. Envirodoq : ENV/2004/0278, 101 p.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J. et Li, J. (2005)** Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348**:363–382.

- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C. et Lescar, J. (2006)** Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom resolution. *J. Bacteriol.* **188**:3391–3401.
- Borrór, D.J. et White, R.E. (1991)** *Le guide des insectes du Québec et de l'Amérique du Nord*, pp. 218–219, Les Guides Peterson, Éditions Broquet, Québec.
- Bosch, D., Schipper, B., Van der Kleij, H., de Maagd, R.A. et Stiekema, W.J. (1994)** Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Bio/Technology* **12**:915–918.
- Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S. et Soberón, M. (2004)** Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* **1667**:38–46.
- Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S. et Peferoen, M. (1992a)** Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:247–253.
- Bravo, A., Jansens, S. et Peferoen, M. (1992b)** Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:237–246.
- Butko, P. (2003)** Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2415–2422.
- Butko, P., Cournoyer, M., Pusztai-Carey, M. et Surewicz, W.K. (1994)** Membrane interactions and surface hydrophobicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIC. *FEBS Lett.* **340**:89–92.
- Cannon, R.J.C. (1993)** *Bacillus thuringiensis* in pest control. *Plant and Microbial Biotechnology Research Series*, vol. 4: *Biological Control: Benefits and Risks* (H.M.T. Hokkanen et J.M. Lynch, éd.), pp. 190–200, Cambridge University Press, Cambridge.
- Capella, A.N., Terra, W.R., Ribeiro, A.F. et Ferreira, C. (1997)** Cytoskeleton removal and characterization of the microvillar membranes isolated from two midgut

- regions of *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**:793–801.
- Carroll, J. et Ellar, D.J. (1993)** An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* **214**:771–778.
- Carroll, J. et Ellar, D.J. (1997)** Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* **245**:797–804.
- Chandra, A., Ghosh, P., Mandaokar, A.D., Bera, A.K., Sharma, R.P., Das, S. et Kumar, P.A. (1999)** Amino acid substitution in α -helix 7 of Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* leads to enhanced toxicity to *Helicoverpa armigera* Hubner. *FEBS Letters* **458**:175–179.
- Chen, X.J., Curtiss, A., Alcantara, E. et Dean, D.H. (1995)** Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **270**:6412–6419.
- Chen, X.J., Lee, M.K. et Dean, D.H. (1993)** Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:9041–9045.
- Choma, C.T., Surewicz, W.K., Carey, P.R., Pozsgay, M., Raynor, T. et Kaplan, H. (1990)** Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. *Eur. J. Biochem.* **189**:523–527.
- Cioffi, M. (1979)** The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue Cell* **11**:467–479.
- Cole, A.R., Gibert, M., Popoff, M., Moss, D.S., Titball, R.W. et Basak, A. (2004)** *Clostridium perfringens* ϵ -toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:797–798.
- Communication-Québec (2006)** *Source d'information sur les organismes génétiquement modifiés*. <http://www.ogm.gouv.qc.ca>.

- Côté, J.-C. (1998) *Bacillus thuringiensis*. État actuel, perspectives d'avenir. *Antennae* 5(1):13–15.
- Coux, F., Vachon, V., Rang, C., Moozar, K., Masson, L., Royer, M., Bes, M., Rivest, S., Brousseau, R., Schwartz, J.-L., Laprade, R. et Frutos, R. (2001) Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* 276:35546–35551.
- Crawford, D.N. et Harvey, W.R. (1988) Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 137:277–286.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. et Dean, D.H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807–813.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. et Dean, D.H. (2006) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html.
- Cummings, C.E., Armstrong, G., Hodgman, T.C. et Ellar, D.J. (1994) Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Mol. Membr. Biol.* 11:87–92.
- Czajkowsky, D.M., Sheng, S. et Shao, Z. (1998) Staphylococcal α -hemolysin can form hexamers in phospholipid bilayers. *J. Mol. Biol.* 276:325–330.
- de Maagd, R.A., van der Klei, H., Bakker, W.J., Stiekema, W.J. et Bosch, D. (1996a) Different domains of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2753–2757.
- de Maagd, R.A., Kwa, M.S.G., van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekema, W.J. et Bosch, D. (1996b) Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1A(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537–1543.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Van Damme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. et Van Rie, J. (1997) Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella*

- xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **248**:748–761.
- Derbyshire, D.J., Ellar, D.J. et Li, J. (2001)** Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Cryst.* **D57**:1938–1944.
- Ding, X., Gopalakrishnan, B., Johnson, L.B., White, F.F., Wang, X., Morgan, T.D., Kramer K.J. et Muthukrishnan, S. (1998)** Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res.* **7**:77–84.
- Dow, J.A.T. (1984)** Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.* **246**:R633–R635.
- Dow, J.A.T. (1986)** Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* **19**:187–328.
- Dow, J.A.T. (1992)** pH gradients in lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* **172**:355–375.
- Dow, J.A.T. et Harvey, W.R. (1988)** Role of midgut electrogenic K⁺ pump potential difference in regulating lumen K⁺ and pH in larval lepidoptera. *J. Exp. Biol.* **140**:455–463.
- Dow, J.A.T. et Peacock, J.M. (1989)** Microelectrode evidence for the electrical isolation of goblet cell cavities in *Manduca sexta* middle midgut. *J. Exp. Biol.* **143**:101–114.
- Duché, D., Parker, M.W., González-Mañas, J.-M., Pattus, F. et Baty, D. (1994)** Uncoupled steps of the colicin A pore formation demonstrated by disulfide bond engineering. *J. Biol. Chem.* **269**:6332–6339.
- Dulmage, H.T. (1970)** Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**:232–239.
- English, L., Robbins, H.L., Von Terch, M.A., Kulesza, C.A., Ave, D., Coyle, D., Jany, C.S. et Slatin, S.L. (1994)** Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**:1025–1035.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. et Koziel, M.G. (1996)** Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:5389–5394.

- Fang, Y., Cheley, S., Bayley, H. et Yang, J. (1997)** The heptameric prepore of a staphylococcal α -hemolysin mutant in lipid bilayers imaged by atomic force microscopy. *Biochemistry* **36**:9518–9522.
- Federici, B.A. (1995)** The future of microbial insecticides as vector control agents. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **11**:260–268.
- Feitelson, J.S., Payne, J. et Kim, L. (1992)** *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* **10**:271–275.
- Feng, Q. et Bechtel, W.J. (1994)** pH-induced conformational transitions of CryIA(a), CryIA(c), and CryIIIA δ -endotoxins in *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry* **33**:8521–8526.
- Forsberg, C.W. (1977)** *Bacillus thuringiensis : ses effets sur l'état de l'environnement*, Conseil national de recherches du Canada, Comité associé du CNRC sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement, Ottawa, Publication CNRC no 15386 du Secrétariat de l'environnement.
- Fortier, M. et Kirouac, M. (2000)** Le bacille de Thuringe : un insecticide pas comme les autres. *Dire* **9**(3):40–41.
- Fortier, M., Vachon, V., Kirouac, M., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2005)** Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *J. Membr. Biol.* **208**:77–87.
- Frutos, R., Rang, C. et Royer, M. (1999)** Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**:227–276.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W. et English, L. (2001)** Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Cryst.* **D57**:1101–1109.
- Garczynski, S.F. et Adang, M.J. (2000)** Investigations of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxin receptor structure and function. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application* (J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-LeRoux, éd.), pp. 181–197, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Garland, W.J. et Buckley, J.T. (1988)** The cytolytic toxin aerolysin must aggregate to disrupt erythrocytes, and aggregation is stimulated by human glycophorin. *Infect. Immun.* **56**:1249-1253.
- Garner, K.J., Hiremath, S., Lehtoma, K. et Valaitis, A.P. (1999)** Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**:527-535.
- Gazit, E., Bach, D., Kerr, I.D., Sansom, M.S.P., Chejanovsky, N. et Shai, Y. (1994)** The α -5 segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: *in vitro* activity, ion channel formation and molecular modelling. *Biochem. J.* **304**:895-902.
- Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, M.S.P. et Shai, Y. (1998)** The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12289-12294.
- Gazit, E. et Shai, Y. (1993)** Structural and functional characterization of the α 5 segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Biochemistry* **32**:3429-3436.
- Gazit, E. et Shai, Y. (1995)** The assembly and organization of the α 5 and α 7 helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Biol. Chem.* **270**:2571-2578.
- Ge, A.Z., Rivers, D., Milne, R. et Dean, D.H. (1991)** Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). *J. Biol. Chem.* **266**:17954-17958.
- Ge, A.Z., Shivarova, N.I. et Dean, D.H. (1989)** Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4037-4041.
- Gerber, D. et Shai, Y. (2000)** Insertion and organization within membranes of the δ -endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. *J. Biol. Chem.* **275**:23602-23607.

- Gill, S.S., Cowles, E.A. et Francis, V. (1995) Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* **270**:27277–27282.
- Gill, S.S., Cowles, E.A. et Pietrantonio, P.V. (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* **37**:615–636.
- Giordana, B., Tasca, M., Villa, M., Chiantore, C., Hanozet, G.M. et Parenti, P. (1993) *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* δ -endotoxin inhibits the K⁺/amino acid cotransporters of lepidopteran larval midgut. *Comp. Biochem. Physiol.* **106C**:403–407.
- Girard, F., Préfontaine, G., Su, Y., Vachon, V., Masson, L., Marceau, L., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2002) Rôle et orientation de l'hélice 4 dans les pores formés par la toxine insecticide Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis*. *Phytoprotection* **83**:56.
- Gold, A.M. (1965) Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. III. Identification of serine as the site of sulfonylation in phenylmethanesulfonyl α -chymotrypsin. *Biochemistry* **4**:897–901.
- Goldberg, L.J. et Margalit, J. (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News* **37**:355–358.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. et Soberón, M. (2002) Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**:242–246.
- Griffitts, J.S., Haslam, S.M., Yang, T., Garczynski, S.F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P.S., Dell, A., Adang, M.J. et Aroian, R.V. (2005) Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* **307**:922–925.
- Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. et van Frankenhuyzen, K. (1992) Suppression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:47–52.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R. et Cygler, M. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**:447–464.

- Güereca, L. et Bravo, A. (1999)** The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. *Biochim. Biophys. Acta* **1429**:342–350.
- Guex, N. et Peitsch, M.C. (1997)** SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714–2723.
<http://ca.expasy.org/spdbv/>
- Guihard, G., Vachon, V., Laprade, R. et Schwartz J.-L. (2000)** Kinetic properties of the channels formed by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein Cry1C in the plasma membrane of Sf9 cells. *J. Membr. Biol.* **175**:115–122.
- Haase, W., Schäfer, A., Murer, H. et Kinne, R. (1978)** Studies on the orientation of brush-border membrane vesicles. *Biochem. J.* **172**:57–62.
- Hannay, C.L. (1953)** Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. *Nature* **172**:1004.
- Harvey, W.R. et Wolfersberger, M.G. (1979)** Mechanism of inhibition of active potassium transport in isolated midgut of *Manduca sexta* by *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *J. Exp. Biol.* **83**:293–304.
- Hendrickx, K., De Loof, A. et Van Mellaert, H. (1990)** Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. *Comp. Biochem. Physiol.* **95C**:241–245.
- Hille, B. (1992a)** Selective permeability: independence. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2^e édition, pp. 337–361, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hille, B. (1992b)** Elementary properties of pores. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2^e édition, pp. 291–314, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hladky, S.B. et Rink, T.J. (1976)** Potential difference and the distribution of ions across the human red blood cell membrane: a study of the mechanism by which the fluorescent cation, diS-C₃-(5) reports membrane potential. *J. Physiol.* **263**:287–319.
- Hodgman, T.C. et Ellar, D.J. (1990)** Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins determined by compilational analysis. *DNA Sequence* **1**:97–106.

- Hoffman, J.F. et Laris, P.C. (1974)** Determination of membrane potentials in human and *Amphiuma* red blood cells by means of a fluorescent probe. *J. Physiol.* **239**:519–552.
- Hofmann, C., Lüthy, P., Hütter, R. et Pliska, V. (1988a)** Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* **173**:85–91.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. et Van Mellaert, H. (1988b)** Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7844–7848.
- Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houtven, A., Vanderbruggen, H. et Vaeck, M. (1988)** Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of the three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2010–2017.
- Höfte, H. et Whiteley, H.R. (1989)** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**:242–255.
- Honée, G., Convents, D., Van Rie, J., Jansens, S., Peferoen, M. et Visser, B. (1991)** The C-terminal domain of the toxic fragment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein determines receptor binding. *Mol. Microbiol.* **5**:2799–2806.
- Hopfer, U., Crowe, T.D. et Tandler, B. (1983)** Purification of brush border membrane by thiocyanate treatment. *Analyt. Biochem.* **131**:447–452.
- Hua, G., Tsukamoto, K., Rasilo, M.-L. et Ikezawa, H. (1998)** Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin. *Gene* **214**:177–185.
- Hussain, S.-R.A., Aronson, A.I. et Dean, D.H. (1996)** Substitution of residues on the proximal side of Cry1A *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**:8–14.

- Ihara, H., Kuroda, E., Wadano, A. et Himeno, M. (1993)** Specific toxicity of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**:200–204.
- Jacobs, M.H. (1952)** The measurement of cell permeability with particular reference to the erythrocyte. *Modern Trends in Physiology and Biochemistry* (E.S.G. Barron, éd.), pp. 149–171, Academic Press, New York.
- James, C (2004)** Preview. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004*, ISAAA Briefs No. 32, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY.
- James, G.T. (1978)** Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Anal. Biochem.* **86**:574–579.
- Jaquet, F., Hütter, R. et Lüthy P. (1987)** Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:500–504.
- Jordão, B.P., Terra, W.R. et Ferreira, C. (1995)** Chemical determinations in microvillar membranes purified from brush-borders isolated from the larval midgut of one coleoptera and two diptera species. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**:417–426.
- Jurat-Fuentes, J.L. et Adang, M.J. (2004)** Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* **271**:3127–3135.
- Kasai, M. et Nunogaki, K. (1988)** Permeability of sarcoplasmic reticulum. *Methods Enzymol.* **157**:437–468.
- Kates, M. (1986)** *Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids*. 2^e édition, Elsevier Science Publishing Company, New York, NY.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J. et Zilberstein, A. (1996)** Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**:365–373.
- Kirouac, M., Vachon, V., Fortier, M., Trudel, M.-C., Berteloot, A., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2006a)** A mechanical force contributes to the “osmotic swelling” of brush border membrane vesicles. *Biophys. J.*, sous presse.

- Kirouac, M., Vachon, V., Noël, J.-F., Girard, F., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2002)** Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1561**:171–179.
- Kirouac, M., Vachon, V., Quievy, D., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2006b)** Protease inhibitors fail to prevent pore formation by the activated *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAa in insect brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:506–515.
- Kirouac, M., Vachon, V., Rivest, S., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2003)** Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe. *J. Membr. Biol.* **196**:51–59.
- Knight, P.J.K., Crickmore, N. et Ellar, D.J. (1994)** The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11**:429–436.
- Knight, P.J.K., Knowles, B.H. et Ellar, D.J. (1995)** Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *J. Biol. Chem.* **270**:17765–17770.
- Knowles, B.H. (1994)** Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* **24**:275–308.
- Knowles, B.H. et Dow, J.A.T. (1993)** The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* **15**:469–475.
- Knowles, B.H. et Ellar, D.J. (1987)** Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **924**:509–518.
- Krasilnikov, O.V. et Sabirov, R.Z. (1992)** Comparative analysis of latrotoxin channels of different conductance in planar lipid bilayers. Evidence for cluster organization. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**:124–128.
- Krasilnikov, O.V., Sabirov, R.Z., Ternovsky, V.I., Merzliak, P.G. et Muratkhodjaev, J.N. (1992)** A simple method for the determination of the pore

- radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Microbiol. Immunol.* **105**:93–100.
- Kumar, A.P., Sharma, R.P. et Malik, V.S. (1996)** The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**:1–43.
- Kwa, M.S.G., de Maagd, R.A., Stiekema, W.J., Vlak, J.M. et Bosch D. (1998)** Toxicity and binding properties of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C to cultured insect cells. *J. Invertebr. Pathol.* **71**:121–127.
- Lambert, B. et Peferoen, M. (1992)** Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* **42**:112–122.
- Lane, N.J., Harrison, J.B. et Lee, W.M. (1989)** Changes in microvilli and Golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial δ -endotoxin. *J. Cell Sci.* **93**:337–347.
- Lane, N.J. et Skaer, H.L. (1980)** Intercellular junctions in insect tissues. *Adv. Insect Physiol.* **15**:35–213.
- Laplante, J.-P. (1998)** *Papillons et chenilles du Québec et de l'est du Canada*, pp. 16–18, Les Éditions de l'Homme, Montréal.
- Lee, M.K., Milne, R.E., Ge, A.Z. et Dean, D.H. (1992)** Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Biol. Chem.* **267**:3115–3121.
- Lee, M.K., Young, B.A. et Dean, D.H. (1995)** Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**:306–312.
- Lemmon, M.A. et Engelman, D.M. (1994)** Specificity and promiscuity in membrane helix interactions. *Q. Rev. Biophys.* **27**:157–218.
- Leonardi, M.G., Marciani, P., Montorfano, P.G., Cappellozza, S., Giordana, B. et Monticelli, G. (2001)** Effect of fenoxycarb on leucine uptake and lipid composition of midgut brush border membrane in the silkworm, *Bombyx mori* (lepidoptera, bombycidae). *Pesticide Biochem. Physiol.* **70**:42–51.

- Leonardi, M.G., Parenti, P., Casartelli, M. et Giordana, B. (1997)** *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa δ -endotoxin affects the K^+ /amino acid symport in *Bombyx mori* larval midgut. *J. Membr. Biol.* **159**:209–217.
- Lesieur, C., Vécsey-Semjén, B., Abrami, L., Fivaz, M. et van der Goot, F.G. (1997)** Membrane insertion: the strategies of toxins. *Mol. Membr. Biol.* **14**:45–64.
- Li, J., Carroll, J. et Ellar, D.J. (1991)** Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**:815–821.
- Li, J., Derbyshire, D.J., Promdonkoy, B. et Ellar, D.J. (2001)** Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:571–577.
- Li, J., Koni, P.A. et Ellar, D.J. (1996)** Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* **257**:129–152.
- Liang, Y. et Dean, D.H. (1994)** Location of a lepidopteran specificity region in insecticidal crystal protein CryIIA from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* **13**:569–575.
- Liang, Y., Patel, S.S. et Dean, D.H. (1995)** Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* **270**:24719–24724.
- Lightwood, D.J., Ellar, D.J. et Jarrett, P. (2000)** Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5174–5181.
- Lorange, M. (2000)** *Surveillance des infections à Bacillus thuringiensis*. Rapport annuel 2000, Laboratoire de santé public du Québec.
- Lorence, A., Darszon, A. et Bravo, A. (1997)** Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Lett.* **414**:303–307.
- Lorence, A., Darszon, A., Díaz, C., Liévano, A., Quintero, R. et Bravo, A. (1995)** δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **360**:217–222.

- Luo, K., Banks, D. et Adang, M.J. (1999a)** Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* CryI δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:457–464.
- Luo, K., Lu, Y.-J. et Adang, M.J. (1996)** A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**:783–791.
- Luo, K., McLachlin, J.R., Brown, M.R. et Adang, M.J. (1999b)** Expression of a glycosylphosphatidylinositol-linked *Manduca sexta* aminopeptidase N in insect cells. *Protein Exp. Purif.* **17**:113–122.
- Luo, K., Sangadala, S., Masson, L., Mazza, A., Brousseau, R. et Adang, M.J. (1997a)** The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as “receptor A” by mediating specific *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**:735–743.
- Luo, K., Tabashnik, B.E. et Adang, M.J. (1997b)** Binding of *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1024–1027.
- Maenz, D.D., Chenu, C., Bellemare, F. et Berteloot A. (1991)** Improved stability of rabbit and rat intestinal brush border membrane vesicles using phospholipase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1069**:250–258.
- Maenz, D.D., Chenu, C., Breton, S. et Berteloot A. (1992)** pH-dependent heterogeneity of acidic amino acid transport in rabbit jejunal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **267**:1510–1516.
- Manceva, S.D., Pusztai-Carey, M., Russo, P.S. et Butko, P. (2005)** A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry* **44**:589–597.
- Manoj Kumar, A.S. et Aronson, A.I. (1999)** Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Bacteriol.* **181**:6103–6107.
- Maroux, S., Coudrier, E., Feracci, H., Gorvel, J.-P. et Louvard, D. (1988)** Molecular organization of the intestinal brush border. *Biochimie* **70**:1297–1306.

- Martin, F.G. et Wolfersberger, M.G. (1995)** *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and larval *Manduca sexta* midgut brush-border membrane vesicles act synergistically to cause very large increases in the conductance of planar lipid bilayers. *J. Exp. Biol.* **198**:91–96.
- Masson, L., Lu, Y.J., Mazza, A., Brousseau, R. et Adang, M.J. (1995)** The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* **270**:20309–20315.
- Masson, L., Mazza, A., Gringorten, L., Baines, D., Anelunias, V. et Brousseau, R. (1994)** Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* **14**:851–860.
- Masson, L., Mazza, A., Sangadala, S., Adang, M.J. et Brousseau, R. (2002)** Polydispersity of *Bacillus thuringiensis* CryI toxins in solution and its effect on receptor binding kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1594**:266–275.
- Masson, L., Préfontaine, G., Péloquin, L., Lau, P.C.K. et Brousseau, R. (1989)** Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* **269**:507–512.
- Masson, L., Tabashnik, B.E., Liu, Y.-B., Brousseau, R. et Schwartz, J.-L. (1999)** Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* **274**:31996–32000.
- Mathur, A., Sethi, A., Jogini, V., Bhargava, Y., Tembe, B.L. et Lala, A.K. (2004)** Energetics of insertion of soluble proteins into membrane. *Curr. Sci.* **87**:181–189.
- McNall, R.J. et Adang, M.J. (2003)** Identification of novel *Bacillus thuringiensis* CryIAc binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**:999–1010.
- Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H. et Park, Y.S. (1999)** Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell-killing action on human cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* **86**:477–486.

- Mizuki, E., Park, Y.S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K. et Ohba, M. (2000) Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**:625–634.
- Moffett, D.F. et Koch, A.R. (1988) Electrophysiology of K^+ transport by midgut epithelium of lepidopteran insect larvae. II. The transapical electrochemical gradients. *J. Exp. Biol.* **135**:39–49.
- Monette, R., Potvin, L., Baines, D., Laprade, R. et Schwartz, J.-L. (1997) Interaction between calcium ions and *Bacillus thuringiensis* toxin activity against Sf9 cells (*Spodoptera frugiperda*, lepidoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:440–447.
- Morse, R.J., Yamamoto, T. et Stroud, R.M. (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* **9**:409–417.
- Nagamatsu, Y., Koike, T., Sasaki, K. Yoshimoto, A. et Furukawa, Y. (1999) The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett.* **460**:385–390.
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S. et Kogure, M. (1998) Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**:727–734.
- Oppert, B. (1999) Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **42**:1–12.
- Parenti, P., Villa, M., Hanozet, G.M., Tasca, M. et Giordana, B. (1995) Interaction of the insecticidal crystal protein CryIA from *Bacillus thuringiensis* with amino acid transport into brush border membranes from *Bombyx mori* larval midgut. *J. Invertebr. Pathol.* **65**:35–42.
- Parker, M.W. et Pattus, F. (1993) Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem. Sci.* **18**:391–395.
- Peña, L. et Séguin, A. (2001) Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends Biotechnol.* **19**:500–506.
- Peyronnet, O., Nieman, B., Génèreux, F., Vachon, V., Laprade, R. et Schwartz, J.-L. (2002) Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1567**:113–122.

- Peyronnet, O., Noulin, J.-F., Laprade, R. et Schwartz, J.-L. (2004)** Patch-clamp study of the apical membrane of the midgut of *Manduca sexta* larvae: direct demonstration of endogenous channels and effect of a *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Insect Physiol.* **50**:791–803.
- Peyronnet, O., Vachon, V., Brousseau, R., Baines, D., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (1997)** Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1679–1684.
- Peyronnet, O., Vachon, V., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2000)** Ion channel activity from the midgut brush border membrane of gypsy moth (*Lymantria dispar*) larvae. *J. Exp. Biol.* **203**:1835–1844.
- Peyronnet, O., Vachon, V., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2001)** Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* **184**:45–54.
- Plášek, J. et Sigler, K. (1996)** Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. *J. Photochem. Photobiol. B* **33**:101–124.
- Potvin, L., Laprade, R. et Schwartz, J.-L. (1998)** Cry1Ac, a *Bacillus thuringiensis* toxin, triggers extracellular Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular stores in Cfl cells (*Choristoneura fumiferana*, lepidoptera). *J. Exp. Biol.* **201**:1851–1858.
- Puntheeranurak, T., Uawithya, P., Potvin, L., Angsuthanasombat, C. et Schwartz, J.-L. (2004)** Ion channels formed in planar lipid bilayers by the dipteran-specific Cry4B *Bacillus thuringiensis* toxin and its $\alpha 1$ – $\alpha 5$ fragment. *Mol. Membr. Biol.* **21**:67–74.
- Racapé, J. (1997)** *Propriétés des pores formés par les toxines parentales et chimériques de Bacillus thuringiensis dans des bicouches lipidiques planes*, Mémoire de maîtrise, Faculté des études supérieures, Université de Montréal.
- Rajamohan, F., Alcantara, E., Lee, M.K., Chen, X.J., Curtiss, A. et Dean, D.H. (1995)** Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **177**:2276–2282.

- Rajamohan, F., Lee, M.K. et Dean, D.H. (1998)** *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **60**:1–27.
- Rand, R.P., et Parsegian, V.A. (1989)** Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **988**:351–376.
- Rang, C., Bergvingson, D., Bohorova, N., Hoisington, D. et Frutos, R (2004)** Competition of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: a basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. *Curr. Microbiol.* **49**:22–27.
- Rang, C., Vachon, V., Coux, F., Carret, C., Moar, W.J., Brousseau, R., Schwartz, J.-L., Laprade, R. et Frutos, R. (2001)** Exchange of domain I from *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins influences protoxin stability and crystal formation. *Curr. Microbiol.* **43**:1–6.
- Rang, C., Vachon, V., de Maagd, R.A., Villalon, M., Schwartz, J.-L., Bosch, D., Frutos, R. et Laprade, R. (1999)** Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2918–2925.
- Rausell, C., Muñoz-Garay, C., Miranda-CassoLuengo, R., Gómez, I., Rudiño-Piñera, E., Soberón, M. et Bravo, A. (2004)** Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry* **43**:166–174.
- Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Koncz-Kalman, Z., Koncz, C., Schell, J. et Zilberstein, A. (1996)** Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3581–3586.
- Reuveni, M. et Dunn, P.E. (1991)** Differential inhibition by *Bacillus thuringiensis* δ endotoxin of leucine and aspartic acid uptake into BBMV from midgut of *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**:1089–1093.
- Richards, A.G. et Richards, P.A. (1977)** The peritrophic membranes of insects. *Annu. Rev. Entomol.* **22**:219–240.

- Riendeau, D., Lemaire, J., Maestracci, D. et Lessard, L. (1986)** Selective release of inner core proteins from intestinal microvillus membrane by lithium diiodosalicylate. *Molec. Cell. Biochem.* **71**:45–52.
- Romeis, J., Meissle, M. et Bigler, F. (2006)** Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat. Biotechnol.* **24**:63–71.
- Rukmini, V., Reddy, C.Y. et Venkateswerlu, G. (2000)** *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* **82**:109–116.
- Sacchi, V.F. et Wolfersberger, M.G. (1996)** Amino Acid absorption. *Biology of the Insect Midgut* (M.J. Lehane et P.F. Billingsley, éd.), pp. 265–292, Chapman & Hall, London.
- Salvesen, G. et Nagase, H. (1989)** Inhibition of proteolytic enzymes. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. (R.J. Beynon et J.S. Bond, éd.), pp. 83–104, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Sangadala, S., Azadi, P., Carlson, R. et Adang, M.J. (2001)** Carbohydrate analyses of *Manduca sexta* aminopeptidase N, co-purifying neutral lipids and their functional interactions with *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**:97–107.
- Sangadala, S., Walters, F.S., English, L.H. et Adang, M.J. (1994)** A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+\text{-K}^+$ efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**:10088–10092.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. et Dean, D.H. (1998)** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775–806.
- Schnepf, E., Tomczak, K., Ortega, J.P. et Whiteley, H.R. (1990)** Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **265**:20923–20930.
- Schultz, S.G. et Solomon, A.K. (1961)** Determination of the effective hydrodynamic radii of small molecules by viscometry. *J. Gen. Physiol.* **44**:1189–1199.

- Schwartz, J.-L., Garneau, L., Masson, L. et Brousseau, R. (1991)** Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anionic channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1065**:250–260.
- Schwartz, J.-L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. et Rousseau, E. (1993)** Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* formation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **132**:53–62.
- Schwartz, J.-L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Préfontaine, G., Brousseau, R. et Masson, L. (1997a)** Restriction of intramolecular movements within the CryIAa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* **410**:397–402.
- Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2000)** Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application* (J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-LeRoux, éd.), pp. 199–217, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Schwartz, J.-L., Lu, Y.-J., Söhnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L. et Adang, M.J. (1997b)** Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* **412**:270–276.
- Schwartz, J.-L. et Masson, L. (2000)** Structure-function analysis of cysteine-engineered entomopathogenic toxins. *Methods in Molecular Biology*, vol. 145: *Bacterial Toxins: Methods and Protocols* (O. Holst, éd.), pp. 101–113, Humana Press, Totowa, NJ.
- Schwartz, J.-L., Potvin, L., Chen, X.J., Brousseau, R., Laprade, R. et Dean, D.H. (1997c)** Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3978–3984.
- Séguin, A. (2000)** Les arbres transgéniques : pour une meilleure protection de la forêt. Avantages écologiques et économiques des arbres transgéniques. *Colloque : Les OGMs, une réalité à découvrir*, Résumé p. 18, Association des biologistes du Québec-Estrie.

- Service canadien des forêts (1999)** *L'état des forêts au Canada 1998–1999*, Ressources naturelles Canada, Ottawa.
- Shelton, A.M., Zhao, J.-Z. et Roush, R.T. (2002)** Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.* **47**:845–881.
- Siegel, J.P. (2001)** The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* **77**:13–21.
- Sims, P.J., Waggoner, A.S., Wang, C.-H., et Hoffman, J.F. (1974)** Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* **13**:3315–3330.
- Slatin, S.L., Abrams, C.K. et English, L. (1990)** Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**:765–772.
- Smedley, D.P., Armstrong, G. et Ellar, D.J. (1997)** Channel activity caused by a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin preparation depends on the method of activation. *Mol. Membr. Biol.* **14**:13–18.
- Smedley, D.P. et Ellar, D.J. (1996)** Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology* **142**:1617–1624.
- Smirnoff, W.A. (1974)** Three years of aerial field experiments with *Bacillus thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce budworm. *J. Invertebr. Pathol.* **24**:344–348.
- SOPFIM (2006)** Société de protection des forêts contre les insectes et maladies (SOPFIM), Québec, <http://www.sopfim.qc.ca>.
- Soveral, G., Macey, R.I. et Moura, T.F. (1997)** Mechanical properties of brush border membrane vesicles from kidney proximal tubule. *J. Membr. Biol.* **158**:209–217.
- Tabashnik, B.E., Malvar, T., Liu, Y.-B., Finson, N., Borthakur, D., Shin, B.-S., Park, S.-H., Masson, L., de Maag, R.A. et Bosch, D. (1996)** Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2839–2844.

- Terra, W.R. et Ferreira, C. (1994)** Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **109B**:1–62.
- Tigue, N.J., Jacoby, J. et Ellar, D.J. (2001)** The α -helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of CryAc1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5715–5720.
- Tran, L.B. (2000)** *Effets du pH sur l'activité biologique des toxines du bacille de Thuringe dans l'intestin moyen du sphinx du tabac*, Mémoire de maîtrise, Faculté des études supérieures, Université de Montréal.
- Tran, L.B., Vachon, V., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2001)** Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4488–4494.
- Uawithya, P., Tuntitippawan, T., Katzenmeier, G., Panyim, S. et Angsuthanasombat, C. (1998)** Effects on larvicidal activity of single proline substitutions in $\alpha 3$ or $\alpha 4$ of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **44**:825–832.
- Uemura, T., Ihara, H., Wadano, A. et Himeno, M. (1992)** Fluorometric assay of potential change of *Bombyx mori* midgut brush border membrane induced by δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**:1976–1979.
- Vachon, V., Laprade, R. et Coulton, J.W. (1986)** Properties of the porin of *Haemophilis influenzae* type b in planar lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **861**:74–82.
- Vachon, V., Paradis, M.-J., Marsolais, M., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (1995a)** Endogenous K^+/H^+ exchange activity in the Sf9 insect cell line. *Biochemistry* **34**:15157–15164.
- Vachon, V., Paradis, M.-J., Marsolais, M., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (1995b)** Ionic permeabilities induced by *Bacillus thuringiensis* in Sf9 cells. *J. Membr. Biol.* **148**:57–63.
- Vachon, V., Préfontaine, G., Coux, F., Rang, C., Marceau, L., Masson, L., Brousseau, R., Frutos, R., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2002)** Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry* **41**:6178–6184.

- Vachon, V., Préfontaine, G., Rang, C., Coux, F., Juteau, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R., Frutos, R., Laprade, R. et Masson, L. (2004a)** Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin CryIAa display altered pore-forming abilities. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6123–6130.
- Vachon, V., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2006)** Influence of the biophysical and biochemical environment on the kinetics of pore formation by Cry toxins. *J. Invertebr. Pathol.* **92**:160–165.
- Vachon, V., Schwartz, J.-L., Masson, L., Brousseau, R. et Laprade, R. (2004b)** Structure and function of *Bacillus thuringiensis* pore-forming insecticidal toxins. *Phys. Can.* **60**:101–107.
- Vadlamudi, R.K., Ji, T.H. et Bulla, L.A., Jr. (1993)** A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* **268**:12334–12340.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H. et Bulla, L.A., Jr. (1995)** Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **270**:5490–5494.
- Valaitis, A.P., Jenkins, J.L., Lee, M.K., Dean, D.H. et Garner, K.J. (2001)** Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins with high affinity. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **46**:186–200.
- Valaitis, A.P., Lee, M.K., Rajamohan, F. et Dean, D.H. (1995)** Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**:1143–1151.
- van der Goot, F.G., Lakey, J., Pattus, F., Kay, C.M., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A. et Buckley, J.T. (1992)** Spectroscopic study of the activation and oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin: identification of the site of proteolytic activation. *Biochemistry* **31**:8566–8570.
- van de Werve, G. (1989)** Liver glucose-6-phosphatase activity is modulated by physiological intracellular Ca^{2+} concentrations. *J. Biol. Chem.* **264**:6033–6036.

- Van Rie, J. (2000)** *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:463–469.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. et Van Mellaert, H. (1989)** Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* **186**:239–247.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. et Van Mellaert, H. (1990)** Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-entotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1378–1385.
- Vié, V., Van Mau, N., Pomarède, P., Dance, C., Schwartz, J.-L., Laprade, R., Frutos, R., Rang, C., Masson, L., Heitz, F. et Le Grimellec, C. (2001)** Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. *J. Membr. Biol.* **180**:195–203.
- Villalon, M., Vachon, V., Brousseau, R., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (1998)** Video imaging analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in Sf9 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1368**:27–34.
- Visser, B., Munsterman, E., Stoker, A. et Dirkse W.G. (1990)** A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *J. Bacteriol.* **172**:6783–6788.
- Visser, B., Van der Salm, T., Van den Brink, W. et Folkers G. (1988)** Genes from *Bacillus thuringiensis entomocidus* 60.5 coding for insect-specific crystal proteins. *Mol. Gen. Genet.* **212**:219–224.
- Von Tersch, M.A., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. et English, L.H. (1994)** Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3711–3717.
- Waggoner, A.S. (1979)** Dye indicators of membrane potential. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **8**:47–68.
- Walker, B. et Bayley, H. (1995)** Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal α -hemolysin identified by cysteine

- scanning mutagenesis and targeted chemical modification. *J. Biol. Chem.* **270**:23065–23071.
- Walters, S., Kulesza, C.A., Phillips, A.T. et English, L.H. (1994)** A stable oligomer of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, CryIIIa. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**:963–968.
- Walters, F.S., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. et English, L.H. (1993)** Ion channel activity of N-terminal fragments from CryA(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**:921–926.
- Wei, J.-H., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.-C. et Aroian R.V. (2003)** *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:2760–2765.
- Whalon, M.E. et Wingerd, B.A. (2003)** Bt: mode of action and use. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **54**:200–211.
- Widner, W.R. et Whiteley, H.R. (1990)** Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **172**:2826–2832.
- Wieczorek, H. (1992)** The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. *J. Exp. Biol.* **172**:335–343.
- Wolfersberger, M.G. (1995)** Permeability of *Bacillus thuringiensis* CryI toxin channels. *Molecular Action of Insecticides on Ion Channels* (J.M. Clark, éd.), pp. 294–301, American Chemical Society, Washington, DC.
- Wolfersberger, M.G. (2000)** Amino acid transport in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **45**:111–120.
- Wolfersberger, M.G., Chen, X.J. et Dean, D.H. (1996)** Site-directed mutations in the third domain of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:279–282.
- Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F.V., Giordana, B. et Hanozet, M. (1987)** Preparation and partial characterization of amino acid

- transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**:301–308.
- Wright, E.M. (1984)** Electrophysiology of plasma membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **246**:F363–F372.
- Wu, D. et Aronson, A.I. (1992)** Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* **267**:2311–2317.
- Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H. et Sato, R. (1997)** Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.* **246**:652–657.
- Yaoi, K., Nakanishi, K., Kadotani, T., Imamura, M., Koizumi, N., Iwahana, H. et Sato, R. (1999)** cDNA cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin binding 120 kDa aminopeptidase N from *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* **1444**:131–137.
- Yunovitz, H., Sneh, B., Schuster, S., Oron, U., Broza, M. et Yawetz, A. (1986)** A new sensitive method for determining the toxicity of a highly purified fraction from δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* on isolated larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* **48**:223–231.
- Yunovitz, H. et Yawetz, A. (1988)** Interaction between the δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* and liposomes. *FEBS Lett.* **230**:105–108.
- Zhan, H., Choe, S., Huynh, P.D., Finkelstein, A., Eisenberg, D. et Collier, R.J. (1994)** Dynamic transitions of the transmembrane domain of diphtheria toxin: disulfide trapping and fluorescence proximity studies. *Biochemistry* **33**:11254–11263.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Rose-Young, L. et Bulla, L.A., Jr. (2005)** Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* **12**:1407–1416.
- Zhuang, M., Oltean, D.I., Gómez I., Pullikuth, A.K., Soberón, M., Bravo, A. et Gill, S.S. (2002)** *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A

toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* 277:13863–13872.

